

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉVALUATION DES FONCTIONS CÉRÉBRALES
CHEZ DES ADOLESCENTS EXPOSÉS AU MANGANÈSE PAR LA
CONSOMMATION D'EAU POTABLE

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN PSYCHOLOGIE

PAR
LAURIE-ANNE DION

JUIN 2017

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Cette thèse est l'un des plus gros accomplissements que j'aurai complétés dans ma vie. Je suis fière du résultat de plus de 6 années de travail. Mon doctorat m'a permis de grandir et de m'affirmer dans mon estime professionnelle. Chaque année a été unique et m'a offert des défis captivants bien qu'exigeants. Cet accomplissement n'aurait pas été possible sans le support de mes superviseurs, de ma famille et de mes proches.

Je tiens spécialement à remercier mes superviseurs, Dave Saint-Amour et Maryse F. Bouchard. Mon projet de thèse n'aurait jamais pu avoir cette envergure et avancer aussi bien sans leur support et leur aide. Dave m'a pris sous son aile alors que je sortais tout juste du baccalauréat et j'ai toujours senti qu'il faisait confiance en mon jugement et en mes connaissances. Il m'a encadrée tout en me permettant d'avancer et d'apprendre avec autonomie. Je lui dois mon doctorat et plusieurs bourses et congrès internationaux!

Un merci spécial à Marie-Ève qui est une coordonnatrice de projet extraordinaire. Elle a été d'une énorme aide tout au long du projet. C'est grâce aussi à l'excellent lien de confiance qu'elle avait avec les participants que le projet a réussi à avoir un taux de participation aussi élevée. Je veux aussi souligner le plaisir que j'ai eu à travailler avec Marie-Ève, Ikram et Sarra lors de nos aventures dans certaines communautés québécoises pour évaluer les participants. Nous avons passé de nombreuses fins de semaine cloîtrées dans des auberges et des chalets et j'en garde de merveilleux souvenirs. Nous avons ri, travaillé, somméillé, mangé, chanté pendant environ 2 ans avec énormément de plaisir.

Je tiens aussi remercier chacun des enfants/adolescents/parents qui ont participé à ce projet. Leur temps, leur patience et leur gentillesse m'ont toujours encouragée. C'est

grâce à eux que les projets de recherche voient le jour et nous en sommes tous reconnaissants.

Je tiens aussi à remercier mes amis. Mon groupe de détaillantes de neuropsychologie avec qui j'ai plein de merveilleux souvenirs et avec qui je garderai contact toute ma vie: Claudia, Laura, Judith, Noémie, Audrey-Anne. Mes amis du primaire et du secondaire ont toujours été là pour moi. Je les aimerai toujours et c'est grâce à eux que je pourrai m'épanouir dans tous les projets que j'entreprendrai.

J'ai aussi la chance d'avoir une famille exceptionnelle qui m'a toujours supportée dans tout ce que j'ai entrepris. Je leur dois mon doctorat, je leur dois mes connaissances, mon jugement, ma curiosité et ma joie de vivre.

Merci à tous!

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	X
RÉSUMÉ	XI
ABSTRACT	XIII
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
CONTEXTE THÉORIQUE.....	5
1.1 Le Mn et ses caractéristiques	5
1.1.1 Le Mn dans l'organisme.....	6
1.1.2 Le Mn dans l'environnement.....	9
1.2 Les biomarqueurs d'exposition.....	10
1.2.1 Imagerie par résonance magnétique (IRM).....	11
1.3 Le globus pallidus	20
1.4 Exposition au Mn	22
1.4.1 Exposition au Mn par l'air	22
1.4.2 Exposition au Mn par l'eau potable.....	30
1.5 Étude initiale	35
1.6 Objectifs et hypothèses de recherche	38
1.6.1 Article 1: Changes in water manganese levels and longitudinal assessment of intellectual function in children exposed through drinking water.	38
1.6.2 Article 2: MRI pallidal signal in children exposed to manganese in drinking water.	40
CHAPITRE II	
ARTICLE 1	41

Article 1 : Changes in water manganese levels and longitudinal assessment of intellectual function in children exposed through drinking water.....	41
2.1 Abstract	41
2.2 Introduction	43
2.3 Methods.....	44
2.4 Results	49
2.5 Discussion	57
2.6 Conclusion.....	61
2.7 Acknowledgments.....	61
2.8 References	62
CHAPITRE III	
ARTICLE 2.....	65
Article 2 : MRI pallidal signal in children exposed to manganese in drinking water.	65
3.1 Abstract	67
3.2 Introduction	69
3.3 Participants and methods.....	71
3.4 Results	77
3.5. Discussion	83
3.6 Conclusion.....	86
3.7 Acknowledgments.....	86
3.8 References	88
CHAPITRE IV	
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	94
4.1 Discussion	94
4.1.1 Article 1 : Étude de suivi.....	94

4.1.2 Article 2 : Étude d'imagerie cérébrale.....	99
4.1.3 Limites des deux études	104
4.1.4 Perspectives futures.....	107
4.1.5 Discussion générale.....	108
4.2 Conclusion.....	109
ANNEXE A	111
Article : Lao, Y., Dion, L.A., Gilbert, G., Bouchard, M.F., Rocha, G., Wang, Y., Leporé, N., & Saint-Amour, D. (2017) Mapping the basal ganglia alterations in children chronically exposed to manganese. <i>Sc Reports</i> , 7.	111
ANNEXE B.....	136
Questionnaire sur la consommation en eau.....	137
Questionnaire sur l'historique de résidence	143
Questionnaire sur le traitement domestique de l'eau	145
Questionnaire général.....	148
BIBLIOGRAPHIE	151

LISTE DES FIGURES

Figure

- 1.1 Image pondérée en T1 du cerveau d'un adulte suite à une exposition professionnelle au Mn. Tirée de l'article de Joseph et coll. (2005). Il est possible d'observer une hyperintensité du signal dans le GP (encerclé en rouge). 15

- 1.2 Calcul de l'index pallidal et exemple d'une segmentation d'un échantillon de voxels dans 1) la matière blanche frontale et 2) le GP dans une image pondérée en T1. Image tirée du second article de la présente thèse (Dion et al., 2016). 16

- 1.3 Représentation des noyaux gris centraux (à gauche) et des boucles principales impliquant le GP (à droite). Image tirée du site de l'Université McGill «Le cerveau à tous les niveaux» (Dubuc). 21

- 2.1 Calculation of the TAWMn. MnW1, Mn concentration at baseline; MnW2, Mn concentration at follow-up; T_{Change} , major changes in water supply; Time 1, number of months between initial examination and major change made to water supply; Time 2, number of months between major change to water supply and follow-up examination. 46

- 2.2 Mean Performance IQ (\pm SE) for all Mn exposure indicators, adjusted for covariates used in regression models (maternal nonverbal intelligence, maternal education, family income). (A) IQ is plotted by median of MnW ($\mu\text{g/L}$) quintiles. The medians and ranges of MnW are as follows: 1st quintiles (lowest), 0.7 (0.1-2.0); 2nd, 3.7 (2.0-9.8); 3rd, 18.5 (9.8-50.6); 4th, 78.6 (50.6-95.0); and 5th (highest), 133.0 (99.9-960.7). (B) IQ is plotted by median of TAWMn ($\mu\text{g/L}$) quintiles. The medians and ranges of TAWMn are as follows: 1st quintiles (lowest), 1.3 (0.2-2.9); 2nd, 9.4 (3.1-18.5); 3rd, 36.1 (20.0-62.4); 4th, 92.5 (63.7-126.9); and 5th (highest), 168.4 (130.7-962.0). (C) IQ is plotted by median of MnH ($\mu\text{g/g}$) quintiles. The medians and ranges of MnH are as follows: 1st quintiles (lowest), 0.2 (0.1-0.3); 2nd, 0.4 (0.3-0.5); 3rd, 0.7 (0.5-0.8); 4th, 1.1 (0.8-1.4); 5th (highest), 2.2 (1.4-12.6). 54

3.1 Regions of interest (ROIs) on a T1-weighted magnetic resonance image (A and B) and a quantitative T1 map (C). FWM: frontal white matter; GP: globus pallidus; PCM: pericranial muscles.	74
3.2 Distribution of MRI indices for children in the low and high water Mn exposure groups (n = 13 and 10, respectively). The boxplots depict the minimum, 25th 50th, 75th percentiles, and maximum value. †p < 0.1; *p < 0.05.	79
3.4 Scatterplot of Mn intake (left) and T1 relaxation time (right) and motor performance. Regression slopes and 95% confidence intervals are also shown.	82

LISTE DES TABLEAUX

Tableau

2.1 Participants' characteristics at follow-up examination and relation with water Mn concentration, time-averaged MnW and hair Mn concentration.	50
2.2 Sex-stratified unadjusted and adjusted associations between Mn exposure indicators and IQ scores at follow-up examination. The association estimates represent the change in IQ scores per 10-fold increase for MnW and TAWMn levels, and per 2-fold increase for MnH (95% CIs).	53
2.3 Partial R ² for each exposure indicators, measured at initial and follow-up examinations, and Performance IQ measured at follow-up.	55
2.4 Description of the 4 exposure groups based on MnW levels measured at baseline and follow-up examination, categorized using a 25 µg/L cut-off.	56
2.5 Mean IQ scores at baseline and follow-up examinations, and change in scores between examinations by change in MnW exposure groups. Group 1 (MnW < 25 µg/L at both examinations), group 2 (MnW <25 µg/L at baseline and ≥25 µg/L at follow-up), group 3 (MnW ≥25 µg/L at baseline and <25 µg/L at follow-up), and group 4 (MnW ≥ 25 µg/L at both examinations).	57
3.1 Participant's characteristics and water Mn exposure indicators for children in the low and high Mn exposure groups.	78

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Abréviations utilisées en français

C.-à-d. : C'est-à-dire
Coll. : Collègues
Etc. : Et cætera
GP : Globus pallidus
IRM : Imagerie par résonance magnétique
Mn : Manganèse
OMS : Organisation Mondiale pour la Santé
P. ex. : Par exemple
QI : Quotient intellectuel

Abréviations utilisées en anglais

CVLT : California verbal learning test for children
GP : Globus pallidus
HOME : Home observation for measurement of the environment
ICP-MS : Inductively coupled plasma mass spectrometry
IQ: Intelligence quotient
Mn : Manganese
MnH : Hair manganese
MnW : Water manganese
MRI : Magnetic resonance imaging
PI : Pallidal index
ROI : Region of interest
TE : Echo time
TI : Inversion time
TR : Repetition time
WASI : Wechsler abbreviated scale of the intelligence
WHO : World Health Organisation

RÉSUMÉ

Le manganèse (Mn) est un nutriment essentiel, mais peut avoir des effets néfastes s'il se retrouve en excès dans l'organisme. D'abord étudié auprès de populations adultes exposées en raison de leur travail (p. ex. : travailleurs dans des mines, soudeurs), la communauté scientifique s'est ensuite penchée sur l'exposition au Mn par la consommation d'eau potable puisque sa présence est fréquente dans les nappes phréatiques. Le développement des enfants semble être le plus affecté par ce type d'exposition, car cette population est particulièrement vulnérable aux effets de contaminants environnementaux. Dans la dernière décennie, le Mn a rejoint le groupe d'éléments neurotoxiques pour le développement (*developmental neurotoxics*) s'ajoutant au méthylmercure, à l'arsenic et au plomb, pour n'en citer que quelques-uns (Grandjean & Landrigan, 2014).

La présente thèse s'intéresse aux effets du Mn sur l'intégrité du cerveau et sur le fonctionnement intellectuel d'enfants exposés par leur consommation d'eau potable. La population d'intérêt est une cohorte de 380 enfants québécois âgés de 6 à 13 ans initialement évalués entre 2007 et 2009. Les résultats de l'étude initiale suggèrent que la concentration de Mn dans l'eau potable est négativement associée au quotient intellectuel (QI), ainsi qu'à diverses épreuves neuropsychologiques (Bouchard et al., 2011; Oulhote, Mergler, Barbeau, et al., 2014). Cette cohorte a été réévaluée en moyenne 4.5 années plus tard aux fins de cette thèse, laquelle est divisée en deux volets: 1) une étude de suivi permettant de réévaluer les fonctions intellectuelles à l'adolescence et 2) une étude d'imagerie cérébrale.

Dans le premier volet, 287 des 380 enfants de la cohorte initiale ont été réévalués à l'adolescence (entre 10 et 17 ans). Les mêmes épreuves standardisées utilisées lors de l'évaluation initiale ont été administrées. Le premier objectif est d'investiguer l'effet d'une exposition au Mn par la consommation d'eau potable à l'adolescence. Le second objectif consiste à examiner les changements d'exposition au Mn des participants entre l'évaluation initiale (âge = 6 à 13 ans) et l'évaluation de suivi (âge = 10-17 ans) et leurs impacts sur le QI. Les résultats de cette étude suggèrent que le Mn dans l'eau est associé négativement avec le QI des filles, principalement le QI de performance. À l'opposé, cette association est positive chez les garçons. De plus, les scores de QI de performance des participants pour qui nous avons observé une augmentation de leur exposition au Mn depuis l'étude initiale auraient légèrement diminué.

Dans le second volet, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a été utilisée pour examiner les dépôts de Mn dans le globus pallidus, une région des noyaux gris centraux, chez un sous-échantillon de 23 enfants (13 faiblement exposés et 10 hautement exposés) alors âgés entre 9 et 15 ans. À l'opposé de ce qui est rapporté dans la littérature, les résultats obtenus suggèrent une plus faible intensité du signal dans le globus pallidus chez les enfants hautement exposés au Mn. Ces résultats pourraient refléter des différences structurelles entre les enfants hautement et faiblement exposés. De plus, les différentes routes d'exposition (inhalation versus ingestion) pourraient expliquer la disparité entre la présente étude et la littérature.

Les résultats présentés dans cette thèse soutiennent l'inclusion du Mn comme élément neurotoxique pour le développement et l'importance de l'implantation de lignes directrices formelles sur la concentration sécuritaire de Mn dans l'eau potable.

Mots-clés : Manganèse, Neurotoxicité, Enfants, Imagerie structurelle, Fonction intellectuelle

ABSTRACT

Manganese (Mn) is an essential nutrient, but excessive exposure to it is neurotoxic. Mn neurotoxicity was first studied with adults exposed through their occupation (e.g. welders). More recently, studies have focused on exposure to Mn that naturally occurs in the environment, such as in underground water used for consumption. Children are particularly vulnerable to the effects of environmental contaminants. In fact, Mn has recently been suspected to be a developmental neurotoxicant, in addition to methylmercury, arsenic and lead.

This thesis aims to investigate the effects of Mn on certain brain structures and on the intellectual function of children exposed to Mn through drinking water. In order to do this, we followed a cohort of 380 children living in the province of Québec. They were previously assessed between 2007 and 2009 when they were 6 to 13 years-old. The results of the initial study suggested that Mn concentration in water was negatively associated with intellectual quotient (IQ) and other neuropsychological tests. This cohort was reassessed on average 4.5 years later for the purpose of this thesis. The reassessment was divided into two parts: 1) a follow-up study to assess changes in Mn exposure and the IQ at adolescence, and 2) a brain imaging study.

In the first study, 287 of the 380 children assessed during the initial study were re-examined at adolescence (10 to 17 years-old). The same standardised tests from the initial assessments were used at follow-up. The first objective was to evaluate the relationship between exposure to Mn from drinking water and IQ scores at adolescence. The second objective was to monitor changes in Mn water exposure and to investigate it in relation to changes in IQ scores between the initial and the follow-up examinations. Results suggest that concentrations of Mn in water are negatively associated with IQ in girls while being positively associated with IQ in boys. The effect was found to be greater on the Performance IQ scores. Moreover, Performance IQ scores slightly decreased for children for whom MnW increased between baseline and follow-up examinations.

In the second study, magnetic resonance imaging (MRI) was used to examine possible Mn deposits in the globus pallidus (GP), a region included in the basal ganglia. A sample of 23 children (13 with exposure to low and 10 with exposure to high water Mn concentrations) aged from 9 to 15 years-old were assessed. It is known that Mn deposits preferentially in the GP creating a hyperintensity in the GP

on T1-weighted images. Our results contrast with previous MRI studies. We observed lower signal intensity in the GP in children with higher Mn concentrations compared with those with lower Mn concentrations. These differences could be explained by cerebral structural differences between these two groups of children. Also, differences in exposure pathways could partly explain the discrepancy between our results and what is found in the literature.

The results presented in this thesis support the inclusion of Mn as a developmental neurotoxicant and the importance of establishing adequate guidelines for safe concentrations of Mn in drinking water.

Keywords : Manganese, Neurotoxicity, Children, Magnetic resonance imaging, Intellectual function.

INTRODUCTION

L'étude de la toxicité des contaminants environnementaux est un sujet fleurissant en recherche depuis la dernière décennie. Nous sommes de plus en plus sensibilisés aux effets néfastes des contaminants de nature anthropogénique ou de source naturelle. Ces études sont importantes pour l'élaboration de normes environnementales nationales ou internationales provenant d'institut promouvant la santé, comme Santé Canada et l'Organisation mondiale pour la santé (OMS). Ces normes doivent d'ailleurs être conçues en tenant compte des populations plus vulnérables aux contaminants environnementaux. Les enfants sont souvent les plus touchés par ces expositions de par leur vulnérabilité aux effets toxiques. En effet, pendant le développement, l'immaturation de certains processus de métabolisation et d'excrétion de l'organisme augmente leur vulnérabilité à ces contaminants (ATSDR Child Health Workgroup, 1997). Pour ces raisons, il est important de cibler la recherche sur l'établissement de normes adéquates pour la réglementation des contaminants présents dans l'environnement en tenant compte des populations les plus vulnérables.

Les études épidémiologiques permettent l'investigation des facteurs environnementaux qui influencent la santé des populations. C'est grâce à ce type d'études que nous pouvons examiner la relation entre l'exposition à un contaminant et ses effets sur les fonctions cérébrales. Les études épidémiologiques sur la neurotoxicité et la neuropsychotoxicité des contaminants environnementaux sont de plus en plus nombreuses. Bien que certains éléments soient déjà connus pour leurs effets délétères sur le développement des enfants, comme le méthylmercure ou le plomb, d'autres ne le sont devenus que récemment. C'est le cas du manganèse (Mn), un élément essentiel qui se retrouve naturellement dans le sol et les eaux souterraines (Grandjean & Landrigan, 2014). Le Mn est déjà connu pour ses effets neurotoxiques

lors d'expositions à forte concentration ou lors de problèmes hépatiques. Il n'a été ajouté que dans les dernières années à la catégorie d'éléments neurotoxiques pour le développement. Bien que de nombreuses études aient pris forme dans la dernière décennie sur ce sujet, il semble que le sujet n'ait été qu'effleuré.

Malgré la présence habituelle de Mn dans l'eau des nappes phréatiques utilisées pour la consommation humaine, la concentration de Mn dans l'eau potable n'a été réglementée au Canada que récemment à la suite de plusieurs études épidémiologiques, dont celle de Maryse F. Bouchard et coll. publiée en 2011 montrant une association négative entre le Mn dans l'eau et le quotient intellectuel (QI) d'enfants exposés au Mn par la consommation d'eau potable. Le nouveau rapport sur le Mn dans l'eau potable du gouvernement du Canada, datant d'août 2016, situe la concentration maximale acceptable (*Maximum acceptable concentration*) de Mn dans l'eau pour la consommation à 100 µg/L (Santé Canada, 2016). Cette norme est effectivement basée sur les études épidémiologiques s'intéressant aux effets du Mn dans l'eau potable sur les enfants. Un objectif a aussi été proposé à 20 µg/L pour des raisons esthétiques (p. ex. : taches sur les vêtements, dépôts dans la tuyauterie) et d'ordre organoleptique (p. ex. : goût indésirable). Malgré cet avancement, l'OMS avait préalablement publié des lignes directrices pour une concentration sécuritaire de Mn dans l'eau potable à 400 µg/L. Elle a depuis discontinué cette ligne directrice en 2011 (Organisation Mondiale de la Santé, 2011). L'OMS argumentait qu'une concentration de Mn de 400µg/L se situait largement au-dessus de ce qui est retrouvé habituellement dans l'eau potable et donc, que des normes formelles n'étaient pas nécessaires. Une réponse à ce changement a été publiée par Frisbie et coll. (2012) démontrant que l'eau souterraine dans plusieurs régions dans le monde, dont le Canada, outrepassait cette concentration de Mn, démontrant l'existence de cette problématique et le besoin d'y remédier par l'adoption de normes pour protéger la santé publique. Par contre, de meilleures données sur l'effet du Mn dans l'eau potable

sur le développement des enfants sont nécessaires pour l'élaboration de normes internationales adéquates et sécuritaires.

La présente thèse s'insère dans ce courant et permet l'étude de la cohorte «Edu-Mango» initialement créée en 2007 par Maryse F. Bouchard en collaboration avec plusieurs chercheurs. Les 380 enfants de cette cohorte proviennent de familles résidant dans 8 communautés du Québec exposées par l'eau potable à différentes concentrations de Mn. Cette cohorte avait initialement été évaluée entre 2007 et 2009 et deux articles scientifiques ont été publiés (Bouchard et al., 2011; Oulhote, Mergler, Barbeau, et al., 2014)

Cette thèse est présentée sous forme de thèse par articles¹ et vise l'approfondissement de nos connaissances sur cette cohorte, d'une part, grâce à l'étude longitudinale de l'effet du Mn sur le fonctionnement intellectuel et, d'autre part, grâce à une étude d'imagerie cérébrale. Elle est divisée en 3 chapitres. Le Chapitre I présente la littérature scientifique actuelle sur le Mn: ses caractéristiques, les méthodes utilisées afin de mesurer sa concentration dans l'organisme, les types d'exposition et son impact sur les fonctions cérébrales. Les objectifs et hypothèses de la thèse y seront aussi dévoilés. Le Chapitre II inclut l'article s'intitulant «*Changes in water manganese levels and longitudinal assessment of intellectual function in children*

¹ Publication 1 : Dion, L.-A., Saint-Amour, D., Sauvé, S., Barbeau, B., Mergler, D., & Bouchard, M. (en voie d'être soumis à la revue *NeuroToxicology*). *Changes in water manganese levels and longitudinal assessment of intellectual function in children exposed through drinking water.*

Publication 2 : Dion, L.-A., Bouchard, M., Sauvé, S., Barbeau, B., Tucholka, A., Major, P., Gilbert, G., Mergler, D., & Saint-Amour, D. (2016). MRI pallidal signal in children exposed to manganese in drinking water. *NeuroToxicology*, 53, 124-131.

exposed through drinking water» et le Chapitre III, l'article «*MRI pallidal signal in children exposed to manganese in drinking water*». Enfin, le Chapitre IV permettra une discussion générale portant sur les résultats des deux articles présentés.

CHAPITRE I

CONTEXTE THÉORIQUE

1.1 Le Mn et ses caractéristiques

Le manganèse (Mn) est le 25^{ième} élément chimique du tableau périodique et le 12^{ième} élément le plus abondant sur terre. Il est aussi un des métaux les plus utilisés dans les productions humaines avec le fer, le cuivre et l'aluminium. Le Mn est retrouvé dans les engrais, les piles électriques, les additifs de carburant (p. ex. : le méthylcyclopentadiényle tricarbonyle de manganèse [MMT]), la peinture et dans plusieurs alliages (p. ex. : l'acier, l'aluminium et le bronze). Puisque son usage est multiple et abondant, de nombreux ouvriers travaillant dans les mines ou les usines de formages de métaux sont exposés au Mn, absorbé principalement par voie respiratoire (ATSDR, 2012).

Le Mn est aussi paramagnétique, c'est-à-dire que lorsqu'il est placé à l'intérieur d'un champ magnétique, les atomes de Mn vont acquérir une aimantation et perturber le champ magnétique externe. Pour cette raison, le Mn peut être observé en imagerie par résonance magnétique (IRM). Nous verrons ultérieurement l'utilisation de l'IRM dans l'étude de la toxicité du Mn.

D'autre part, ce métal fait partie des oligoéléments, c'est-à-dire qu'il est nécessaire à certains processus physiologiques des organismes vivants. Il permet notamment le métabolisme normal des acides aminés, des lipides, des protéines, des glucides et de certaines familles enzymatiques. Le Mn protège aussi contre le stress oxydatif, cependant, une concentration excessive du métal dans l'organisme entraîne une augmentation du stress oxydatif (Komatsu et al., 2009). L'apport quotidien nécessaire à notre organisme, qui se situe autour de 5 mg Mn/kg, est habituellement atteint puisque le Mn est présent dans une grande variété d'aliments: les grains, les noix, les légumes, le thé, etc. (ATSDR, 2012; Santé Canada, 1987). Pour cette raison, il n'existe pas de cas de carence isolée en Mn chez les humains. De plus, l'ingestion d'aliments n'est pas reconnue comme une source d'intoxication au Mn à cause des mécanismes homéostatiques régulant son absorption. Seules la nutrition parentérale (c.-à-d. suppléer l'alimentation par voie intraveineuse) chez les nouveau-nés et les préparations pour nourrisson sont associées à une augmentation excessive de l'apport quotidien en Mn pouvant résulter en une neurotoxicité (Erikson, Thompson, Aschner, & Aschner, 2007).

1.1.1 Le Mn dans l'organisme

Le Mn dans l'organisme est soumis à un contrôle homéostatique qui régule sa concentration. Lorsque le Mn est présent de façon trop importante dans l'environnement ou que certains problèmes surviennent dans les organes qui régulent son élimination (p. ex. : le foie), les mécanismes homéostatiques ne permettent plus d'éliminer convenablement le Mn et les concentrations dans l'organisme et dans le cerveau augmentent.

Les voies principales d'exposition sont par ingestion et par inhalation. Lorsque le Mn présent dans l'alimentation ou dans l'eau potable est ingéré, 1 à 5% de sa

concentration est habituellement absorbée dans le tube digestif (Aschner, Erikson, & Dorman, 2005). Le Mn est ensuite absorbé par le foie et sécrété dans la bile pour être éliminé par l'intestin. Lorsque ce système est surchargé, les sécrétions pancréatiques et autres sécrétions intestinales peuvent prendre le relais. Ainsi, seulement une faible concentration est retenue dans le système sanguin. Lorsque le Mn se retrouve en particules aéroportées et qu'il est inhalé, celui-ci entre dans l'organisme principalement par voie nasale via la muqueuse olfactive et par voie pulmonaire. Il contourne ainsi le système gastro-intestinal. La muqueuse olfactive offre une entrée immédiate vers le bulbe olfactif et le reste du système nerveux. Les particules de Mn déposées sur l'épithélium olfactif peuvent être transportées directement jusqu'au bulbe (Santé Canada, 2010). Une étude effectuée chez des adolescents vivant à proximité d'une usine de ferroalliages contenant du Mn a d'ailleurs démontré une association entre l'exposition au Mn et une perte des capacités d'identification des odeurs (Lucchini et al., 2012). L'absorption pulmonaire est aussi plus importante et le Mn est retenu de façon plus importante dans la circulation systémique que suite à son ingestion (Andersen, Gearhart, & Clewell, 1999).

La cinétique (c.-à-d. l'absorption, la distribution et l'élimination) du Mn dans l'organisme est dépendante de différents facteurs, dont la source d'exposition, la présence de fer dans l'organisme et les troubles métaboliques. La constitution génétique et le régime alimentaire peuvent aussi affecter le taux d'élimination du Mn. Le sexe est un autre facteur important dont il faut tenir compte dans la cinétique du Mn. En effet, les femmes ont des concentrations de Mn dans le sang plus élevées que les hommes, telles que documentées dans l'étude de Oulhote et coll. (2014). Les femmes absorberaient aussi davantage le Mn et sa demi-vie dans le sang serait plus courte que chez les hommes (Finley, Johnson, & Johnson, 1994).

La biodisponibilité du Mn dans la circulation sanguine est donc plus élevée suite à une exposition au Mn provenant de l'environnement ou suite à certains troubles métaboliques. Il se distribuera ainsi en plus grande quantité dans les tissus du corps et dans le cerveau. Le transport du Mn au cerveau s'effectue à travers les capillaires cérébraux, la muqueuse olfactive et le liquide céphalo-rachidien (via le plexus choroïde). La demi-vie estimative du Mn dans le cerveau est d'environ 53 jours chez l'humain (Santé Canada, 2016). Les transporteurs membranaires transferrine et *divalent metal transporter* (DMT-1) semblent être les principaux moyens pour le Mn d'entrer dans le système nerveux central en traversant la barrière hémato-encéphalique. Les récepteurs « transferrine » se retrouvent de façon plus abondante dans certaines régions du cerveau, dont le noyau accumbens, le noyau caudé et le putamen. Ces régions ont des fibres afférentes qui permettront au Mn de se distribuer dans d'autres parties du cerveau, dont le globus pallidus (Aschner et al., 2005). Le Mn partage certains transporteurs avec le fer, dont le DMT-1. Lorsque les concentrations de fer sont trop basses dans l'organisme, le nombre de transporteurs augmente afin d'optimiser son absorption. Une plus forte concentration de Mn sera parallèlement transportée vers le système nerveux grâce à ces transporteurs. Pour cette raison, les déficiences en fer sont associées à de plus fortes concentrations de Mn dans l'organisme (Finley, 1999; Y. Kim & Park, 2014). De plus, le Mn s'accumule dans les neurones, astrocytes et oligodendrocytes du globus pallidus, de la substance noire et du striatum. Lorsque le Mn se retrouve en excès dans le cerveau, il altère principalement le système dopaminergique. Le Mn peut oxyder la dopamine et altérer les fonctions des mitochondries (essentiels à la production d'énergie et d'adénosine triphosphate [ATP]), ce qui résulte en une augmentation du stress oxydatif. Les systèmes glutaminergique et GABAergique seraient non influencés par sa neurotoxicité (Neal & Guilarte, 2013). Des symptômes extrapyramidaux s'apparentant à la maladie de Parkinson apparaissent suite à une intoxication au Mn et à ses conséquences sur le système dopaminergique. Cette symptomatologie associée à l'exposition au Mn s'appelle le manganisme.

Le Mn est un cofacteur pour certaines enzymes qui permettront la défense antioxydante, la formation des os, la métabolisation de certaines protéines et autres fonctions. Les carences en Mn ne sont pas bien documentées. Néanmoins, une relation en U entre les concentrations de Mn dans l'organisme et le développement a été observée dans quelques études (Bhang et al., 2013; Chung et al., 2015; Haynes et al., 2015). En effet, les faibles et les fortes concentrations de Mn dans le sang étaient associées négativement au développement ainsi qu'à certaines fonctions cognitives. Les résultats de ces études reflètent les différents rôles du Mn qui est à la fois essentiel à l'organisme et potentiellement neurotoxique.

1.1.2 Le Mn dans l'environnement

Le Mn se retrouve naturellement dans l'eau de surface (lacs et rivières) et les eaux souterraines (ou aquifères). Il se trouve aussi dans le sol et les socles rocheux qui peuvent s'éroder et se solubiliser dans ces eaux. Les activités humaines et la proximité de certains types d'usines peuvent aussi augmenter la concentration de Mn dans l'eau (Organisation Mondiale de la Santé, 2011; Wright, Amarasinghe, Woolf, Jim, & Bellinger, 2006). En 2016, Santé Canada a mis à jour son document sur le Mn dans l'eau potable et rapporte une concentration maximale acceptable (*maximum acceptable concentration*) de 100 µg/L et un objectif esthétique de 20 µg/L (Santé Canada, 2016). L'OMS, pour sa part, a discontinué ses normes de 400 µg/L de Mn dans l'eau potable en 2011, argumentant que peu de résidences excédaient ce niveau (Organisation Mondiale de la Santé, 2011). Au Québec, les niveaux de Mn ont été mesurés dans les usines de traitement et les systèmes de distribution d'eaux souterraines entre 2010 et 2014. Des 126 échantillons d'eau traitée, 22 se situaient au-dessus de 50 µg/L et 7 au-dessus de 200 µg/L (Santé Canada, 2016).

Le Mn présent dans l'atmosphère est principalement d'origine industrielle, liée à des processus de fabrication d'alliages métalliques. En moyenne, le niveau de Mn dans l'air ambiant à proximité d'une source industrielle d'émissions s'étend entre 220 et 300 ng/m³ (Organisation Mondiale de la Santé, 2011). Les émissions causées par les véhicules à moteur à essence sont aussi à l'origine de la présence de particules de Mn dans l'air, mais de moindre mesure (Santé Canada, 1987). Dans une étude effectuée à Montréal en 1994, la concentration de Mn dans l'air se situait à des niveaux supérieurs à 40 ng/m³ et était associée à la densité de trafic (Loranger, Zayed, & Forget, 1994).

Bref, le Mn est présent dans les aliments, dans l'eau, dans le sol et dans l'air. Bien qu'il soit nécessaire pour le métabolisme, il peut avoir des effets néfastes s'il se retrouve de façon excessive dans l'organisme.

1.2 Les biomarqueurs d'exposition

En toxicologie, le besoin d'évaluer de façon objective la présence d'un contaminant environnemental dans l'organisme a mené à l'utilisation de biomarqueurs d'exposition. Un biomarqueur est une mesure biologique permettant d'évaluer la concentration de diverses substances dans l'organisme. La salive, les cheveux, l'urine, les fèces, les ongles, les dents et le sang sont des exemples de biomarqueurs utilisés en toxicologie. Bien que plusieurs articles décrivent les différents biomarqueurs utiles à l'évaluation de la toxicité du Mn, il n'y a pas de consensus clair sur quel biomarqueur est le plus adéquat (Smith et al., 2001; Zheng, Fu, Dydak, & Cowan, 2011).

Lors de l'évaluation des enfants exposés au Mn par la consommation d'eau potable, la plupart des études utilisent les échantillons de cheveux ou de sang comme biomarqueurs d'exposition. Selon une revue de littérature effectuée par Coetzee et coll. (2016), la concentration de Mn dans les cheveux serait le biomarqueur le plus consistant et le plus valide pour l'étude de cette population. Toutefois, il ne serait pas adéquat lorsque l'on examine des participants exposés par des particules de Mn se trouvant dans l'air. En effet, ces particules peuvent se déposer sur les cheveux et contaminer les échantillons (c.-à-d. contamination exogène), ce qui aurait comme conséquence d'augmenter la variabilité entre les échantillons et de surestimer l'exposition.

Plusieurs études utilisent le sang comme biomarqueur (par ex.:Claus Henn et al., 2012; Khan et al., 2011; Y. Kim et al., 2009; Wasserman et al., 2006; Wasserman et al., 2016). Toutefois, Zheng et ses collaborateurs (2011) mentionnent que le sang reflète une exposition récente et active. De plus, le Mn a une demi-vie d'environ 2 heures dans le sang et de 2 à 10 semaines dans l'organisme suivant une administration intraveineuse de Mn (Crossgrove & Zheng, 2004; O'Neal & Zheng, 2015; Zheng, Kim, & Zhao, 2000). Ce biomarqueur serait donc adéquat pour une exposition aiguë récente et moins pour une exposition à long terme comme chez les enfants exposés au Mn par la consommation d'eau potable.

1.2.1 Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM peut aussi être utilisée comme biomarqueur d'exposition au Mn. Comme préalablement expliqué, le Mn est un métal paramagnétique et cette propriété lui permet d'interagir avec un champ magnétique externe. Les sections subséquentes détaillent ce qu'est l'IRM et comment cette technique s'insère dans l'étude du Mn.

1.2.1.1 Qu'est-ce que l'IRM

L'IRM est une technique d'imagerie non invasive et sécuritaire qui permet de créer des images tridimensionnelles. Cette technique se base sur certaines propriétés des molécules d'hydrogène se trouvant dans les particules d'eau des différents tissus du corps humain. D'abord, l'hydrogène est une molécule constituée d'un seul proton. Le proton est chargé, de façon à ce que le noyau tourne autour d'un axe et crée un champ magnétique. Les axes des protons du corps humain ont habituellement des directions aléatoires. Lorsque les protons sont situés dans un champ magnétique externe, leurs axes s'alignent avec ce champ magnétique.

Par la suite, l'appareil d'IRM est fait en forme de cylindre et c'est à l'intérieur de ce cylindre que le sujet est placé. L'appareil est constitué principalement de tiges en spirale permettant la supraconduction d'électricité. Ceci crée un champ magnétique principal (B_0), longitudinal au sujet, allant des pieds à la tête. Donc, lorsqu'un sujet entre dans l'appareil d'IRM, la majorité des protons de son corps s'alignent avec le champ magnétique B_0 . Par la suite, le sujet est exposé à des pulsations de radiofréquences. Ces pulsations « stressent » les protons et créent une inversion des axes des protons. Lorsque les pulsations de radiofréquence cessent, les protons se « relaxent » et retrouvent tranquillement leur alignement initial, c'est-à-dire dans la même direction que le champ magnétique B_0 . Le temps entre le moment où les axes sont inversés et le moment où les axes se réalignent avec le champ magnétique B_0 s'appelle « temps de relaxation T_1 ». C'est le temps de relaxation des protons qui sera mesuré et qui permettra la création d'images.

Le temps de relaxation longitudinal (T_1) et transversal (T_2) des protons varie selon la composition (c.-à-d. contenu de gras, d'os ou d'eau) des différents tissus du corps humain. Ainsi, les protons se trouvant dans la matière blanche, la matière grise et le

liquide céphalo-rachidien (LCR) ont des temps de relaxation T1 différents : celui de la matière blanche est plus court que celui de la matière grise et le temps de relaxation de la matière grise est plus court que celui du LCR. C'est grâce à ces différences que le contraste entre les structures dans les images d'IRM est possible. Un temps de relaxation court se traduit par une intensité du signal plus forte dans une image dite pondérée en T1. Ainsi, dans ce type d'images, la matière blanche paraît blanche, la matière grise est grise et le LCR est noir (voir la Figure 1.1 dans la section «L'index pallidal»).

De plus, la création d'images tridimensionnelles est possible grâce à deux champs magnétiques supplémentaires appelés gradients magnétiques. Ceux-ci sont positionnés sur deux axes différents et agissent localement, c'est-à-dire selon la région du corps qui nous intéresse. Ces gradients magnétiques, comme leur nom l'indique, ne sont pas homogènes. Ceci permet à chaque point dans l'espace, appelé voxel (équivalent 3D du pixel d'images 2D), d'avoir une signature magnétique particulière. Ainsi, il est possible de recréer une image tridimensionnelle de l'espace d'intérêt où chaque voxel a sa propre intensité. Il en résulte une image tridimensionnelle où l'intensité des voxels permet d'obtenir une image contrastée.

Aussi, la résolution spatiale de l'image dépend de la force du champ magnétique dont l'unité est le Tesla (T). Les appareils d'IRM conventionnels utilisés en recherche se situent habituellement entre 1.5 et 7 T. Des images formées à l'aide d'un appareil d'IRM à 3T auront donc une résolution spatiale et un contraste plus élevés que celles à 1.5T.

1.2.1.2 L'index pallidal

Les propriétés paramagnétiques du Mn rendent cet élément intéressant à étudier à l'aide de l'IRM. Le Mn a un temps de relaxation très court et même plus court que celui de la matière blanche. Pour cette raison, une substance composée de Mn se trouvant dans un appareil d'IRM aura un temps de relaxation T1 très court et il sera donc possible d'observer une hyperintensité (ou forte intensité) du signal IRM dans une image pondérée en T1.

Les études d'imagerie s'intéressant à des sujets exposés à de fortes concentrations de Mn dans l'air rapportent que le Mn se déposerait préférentiellement dans le globus pallidus (GP), une structure incluse dans les noyaux gris centraux (Dydak, Xu, et al., 2011; Fitsanakis et al., 2006; Y. Kim et al., 1999; Nelson, Golnick, Korn, & Angle, 1993; Park et al., 2007). Il est alors possible d'observer chez ces sujets une hyperintensité dans le GP dans une image pondérée en T1 (voir Figure 1.1).

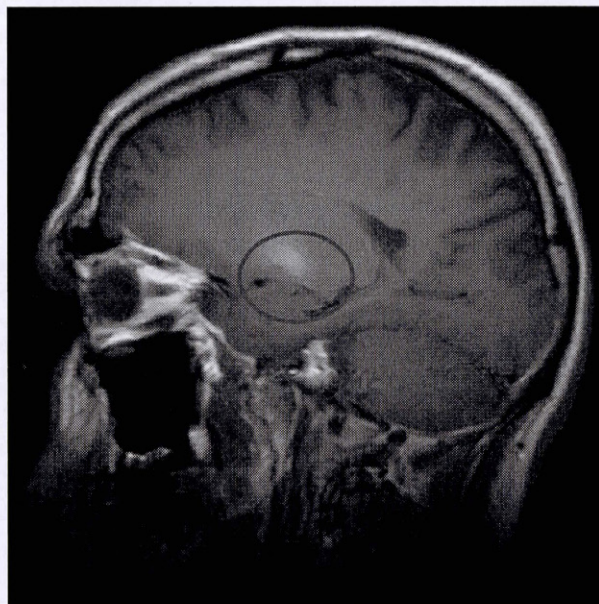


Figure 1.1 Image pondérée en T1 du cerveau d'un adulte suite à une exposition professionnelle au Mn. Tirée de l'article de Joseph et coll. (2005). Il est possible d'observer une hyperintensité du signal dans le GP (encerclé en rouge).

Park et coll. (2007) ont rapporté une légère augmentation de la concentration de Mn dans le noyau caudé, le putamen, le lobe frontal et la substance noire chez des singes exposés au Mn par inhalation. Une augmentation dite «dose-dépendante» et plus importante a seulement été observée dans le GP: plus l'exposition était importante, plus la concentration de Mn dans les tissus du GP était grande. Des études animales ont aussi observé une hyperintensité du signal IRM dans l'hippocampe, le gyrus denté, le bulbe olfactif et l'hypophyse chez des rats exposés au Mn (Dydak, Xu, et al., 2011; Finkelstein et al., 2008). Chez l'humain, les sites préférentiels de dépôts de Mn, outre le GP, sont le bulbe olfactif, le putamen et la matière blanche frontale (Sen et al., 2011).

L'analyse de ce type d'images afin d'évaluer la présence ou l'absence d'une hyperintensité dans le GP peut être faite de façon subjective par un radiologue. Dans les milieux cliniques, le diagnostic d'une intoxication au Mn peut être facilité par l'analyse d'une image IRM du cerveau du patient. Le radiologue peut catégoriser des images pondérées en T1 selon l'intensité apparente du GP (Choi et al., 2007). Si une hyperintensité dans le GP est observée, l'intoxication au Mn fera partie du diagnostic différentiel et la source de cette intoxication devra être investiguée (p. ex. : problème hépatique, exposition aiguë au Mn, etc). Une mesure a été parallèlement élaborée par Krieger et coll. (1995) pour quantifier l'intensité du signal dans le GP: l'index pallidal. Cette mesure objective a largement été utilisée en recherche et est habituellement utilisée dans les études IRM s'intéressant à l'exposition au Mn (Chang, Kim, et al., 2009; Choi et al., 2007; Lucchini et al., 2000).

L'index pallidal est un ratio de l'intensité du GP sur l'intensité de la matière blanche frontale sous-corticale. Il faut d'abord comprendre que chaque image pondérée en T1 a une intensité qui lui est propre. Celle-ci peut donc varier d'une acquisition à l'autre. L'index pallidal permet d'évaluer l'intensité du signal du GP en contrôlant pour la variabilité d'intensité entre les images pondérées en T1. Le calcul de l'index pallidal consiste à diviser l'intensité globale du GP par l'intensité d'un échantillon de voxels provenant de la matière blanche frontale sous-corticale. Le tout est ensuite multiplié par 100 (voir Figure 1.2). L'utilisation de la matière blanche frontale comme structure de référence avait été adoptée initialement puisque la littérature scientifique suggérant que le Mn se dépose ailleurs que dans le GP était absente à l'époque. La matière blanche était donc considérée comme une région non affectée par l'exposition au Mn.

$$\text{Index pallidal} = \left(\frac{\text{Intensité du GP}}{\text{Intensité de la matière blanche frontale}} \right) \times 100$$

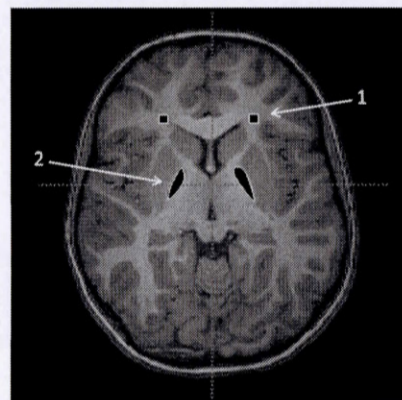


Figure 1.2 Calcul de l'index pallidal et exemple d'une segmentation d'un échantillon de voxels dans 1) la matière blanche frontale et 2) le GP dans une image pondérée en T1. Image tirée du second article de la présente thèse (Dion et al., 2016).

L'index pallidal a largement été validé comme outil sensible à l'exposition au Mn (Li et al., 2014). Plusieurs études ont observé une association entre la concentration de Mn dans le sang et l'index pallidal chez des personnes exposées au Mn en milieu de travail (Jiang et al., 2007; Y. Kim, 2004). Chang (2009) suggère même que l'index pallidal serait un meilleur prédicteur de la performance à certaines épreuves

neuropsychologiques (empan mnésique, épreuve du stroop [lecture de mots] et la motricité fine [épreuve du *grooved pegboard*]) que la concentration de Mn dans le sang.

Récemment, certains auteurs ont critiqué l'utilisation de l'index pallidal à cause de la possible accumulation de Mn dans d'autres structures corticales, dont la matière blanche frontale (Dorman, Struve, Wong, Dye, & Robertson, 2006; Long et al., 2014; Sen et al., 2011). Une telle accumulation aurait pour effet d'augmenter l'intensité du signal dans la matière blanche frontale. Conséquemment, l'index pallidal sous-estimerait l'intensité du GP. Guilarte et coll. (2006) ont proposé une alternative pour pallier ce problème. Dans leur étude faite sur des singes rhésus, ils ont modifié la structure de référence dans le calcul de l'index pallidal. En effet, ils ont utilisé une référence dans les muscles péricraniens au lieu d'utiliser une référence dans la matière blanche frontale. Les résultats de cette étude démontrent clairement que l'index pallidal avec référence dans les muscles péricraniens estimerait mieux l'accumulation locale de Mn dans le cerveau comparativement à celui avec la référence dans la matière blanche. À notre connaissance, cette méthode n'a toutefois pas été utilisée dans d'autres études. Dydak et coll. (2011) ont utilisé une autre région de référence pour l'index pallidal et cette fois chez l'humain: les muscles du cou. Dans leur étude, l'index pallidal avec référence dans les muscles du cou était significativement plus élevé chez les travailleurs exposés au Mn que chez les sujets témoins. Il n'y avait pas de différence entre les groupes pour l'index pallidal avec référence dans la matière blanche frontale. Les auteurs suggèrent que l'index pallidal avec référence dans les muscles du cou serait plus sensible à une exposition au Mn chez l'humain. L'étude comporte toutefois certaines limites, dont un pouvoir statistique faible en raison du petit échantillon de sujets.

Ces découvertes ont incité les chercheurs à trouver des mesures alternatives pour mesurer l'intensité du signal IRM dans le GP. La mesure du temps de relaxation T1 dans le GP est la mesure alternative la plus récente.

1.2.1.3 Temps de relaxation

Le temps de relaxation T1 permet de quantifier directement le temps de relaxation, en milliseconde, des structures du cerveau. Comme nous l'avons vu précédemment, le temps de relaxation T1 est inverse à l'intensité du signal: plus le temps de relaxation T1 est court, plus l'intensité du signal dans une image pondérée en T1 sera forte. Donc, il faut s'attendre à mesurer un temps de relaxation court dans le GP chez un individu fortement exposé au Mn. Cette technique offre une mesure indirecte de l'intensité du signal sans avoir à utiliser de structures de référence, ce qui est un net avantage lorsque l'on sait que les dépôts de Mn affectent différentes régions du cerveau.

Afin de quantifier le temps de relaxation T1, des procédures d'acquisition et d'analyses d'image IRM spécifiques sont utilisées pour créer des cartes quantitatives T1 (*quantitative T1 maps*) du cerveau. Ces acquisitions sont normalisées afin de diminuer l'impact du mouvement des participants sur les cartes quantitatives T1. C'est grâce à l'analyse de ces cartes que nous pouvons mesurer le temps de relaxation T1 (ms).

Choi et ses coll. (2007) ont évalué des travailleurs exposés au Mn présent dans l'air à l'aide de l'index pallidal et du temps de relaxation T1. Les deux mesures étaient significativement différentes entre les travailleurs exposés et les non-exposés. Elles étaient aussi toutes deux corrélées avec les concentrations de Mn dans l'air.

Néanmoins, seul le temps de relaxation T1 corrélait avec la concentration de Mn dans le sang. Lewis et coll. (2016) ont montré qu'une exposition récente à de relativement faibles concentrations de Mn chez des soudeurs était associée à une diminution du temps de relaxation T1. L'exposition n'était cependant pas associée à la concentration de Mn dans le sang ou à l'index pallidal. Une étude faite chez les singes a montré que l'index pallidal et le temps de relaxation T1 dans le GP étaient corrélés avec les concentrations de Mn dans le GP mesurées en post-mortem (Dorman et al., 2006). Le temps de relaxation T1 semble donc être un biomarqueur IRM adéquat puisqu'il est sensible à l'exposition au Mn.

Enfin, il est important d'ajouter que d'autres métaux sont paramagnétiques et peuvent influencer l'intensité du signal IRM ou le temps de relaxation, comme le calcium, le cuivre et le fer. Puisque le fer et le Mn partagent certains transporteurs membranaires, ils peuvent s'accumuler dans des régions similaires du cerveau. Alors que l'influence du Mn en imagerie a été étudiée exclusivement en utilisant des images pondérées en T1 où une hyperintensité est observée, l'influence du fer a principalement été documentée à l'aide des images pondérées en T2. En effet, le fer semble raccourcir le temps de relaxation transversale, T2*, et une hypointensité en image pondérée en T2 est observée lorsque des dépôts de fer sont présents dans le cerveau. Quelques études ont observé les changements d'intensité causés par le fer dans des images pondérées en T1 et leurs résultats se contredisent (Valdés Hernandez, Maconick, Tan, & Wardlaw, 2012). Pour cette raison, les images pondérées en T1 sont rarement utilisées pour détecter l'effet de potentiel dépôt de fer. De plus, dans une étude *ex vivo* de Criswell et coll. (2015), des travailleurs exposés au Mn par leur occupation avaient des concentrations de fer légèrement plus faibles dans les noyaux gris centraux que les travailleurs non exposés.

1.3 Le globus pallidus

Avant d'aborder les effets spécifiques d'une exposition au Mn chez l'humain, examinons les caractéristiques de la structure affectée principalement par le Mn: le GP.

Le GP est une structure sous-corticale incluse dans les noyaux gris centraux, qui comporte aussi le putamen et le noyau caudé. Le GP est impliqué dans plusieurs boucles cortico-sous-corticales avec, entre autres, le thalamus et les aires motrices du cortex. La boucle principale impliquant ces structures permet le déclenchement volontaire de mouvements adaptés (voir Figure 1.3). Dans cette boucle, le GP a un rôle principalement inhibiteur. Au repos, il inhibe les neurones de certaines régions du thalamus. Lorsque la boucle est activée, ce sont les neurones du putamen qui vont inhiber l'action inhibitrice du GP sur le thalamus. Le thalamus ira à son tour interagir avec l'aire motrice supplémentaire et l'initiation de mouvements sera possible (Dubuc). Pour cette raison, la dysfonction du GP joue un rôle prééminent dans la maladie de Parkinson qui est caractérisée par des symptômes moteurs (p. ex. : tremblements, rigidité et trouble de la marche)

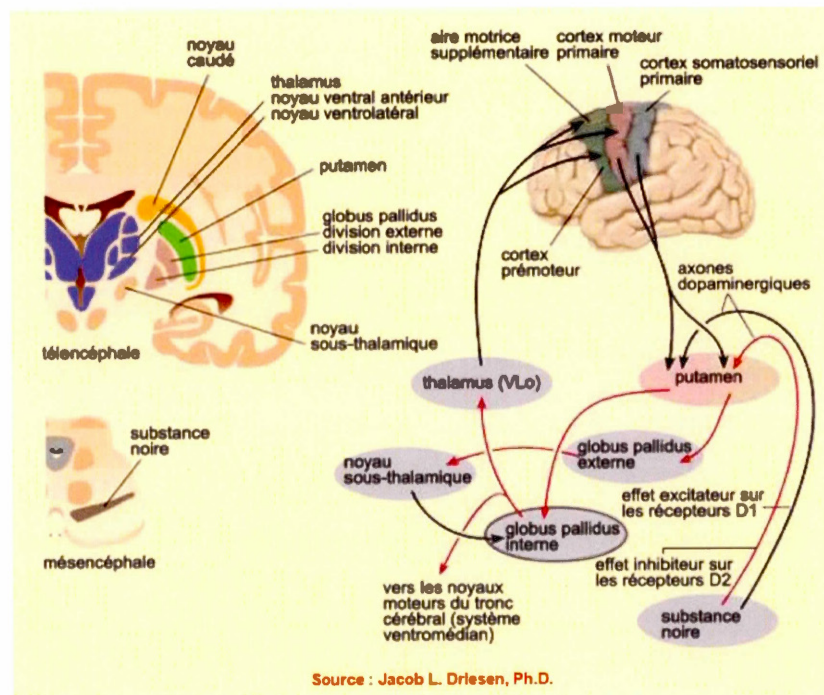


Figure 1.3 Représentation des noyaux gris centraux (à gauche) et des boucles principales impliquant le GP (à droite). Image tirée du site de l'Université McGill «Le cerveau à tous les niveaux» (Dubuc).

À cause de ses multiples connexions avec d'autres régions du cerveau, le GP serait impliqué indirectement dans divers processus cognitifs. Des études rapportent d'ailleurs son rôle dans la flexibilité cognitive (Van Schouwenburg et al., 2014), l'apprentissage par stratégie stimulus-réponse et le système de récompense (Schroll et al., 2015).

Une altération du fonctionnement du GP peut être observée après une exposition excessive au Mn. Nous verrons dans la prochaine section les symptômes associés à différentes sources d'exposition au Mn.

1.4 Exposition au Mn

Le Mn possède à la fois les rôles contrastants d'oligoélément et d'élément neurotoxique. Lorsque la concentration de Mn devient trop élevée dans l'organisme et que les processus homéostatiques ne peuvent plus gérer le surplus, le Mn circule de façon plus importante dans le cerveau. Nous examinerons dans les prochains paragraphes les effets d'expositions au Mn provenant de différentes sources: l'inhalation de particules dans l'air et la consommation d'eau. Les études sur les adultes et les enfants seront regroupées afin d'apprécier les différents effets du Mn sur ces populations.

1.4.1 Exposition au Mn par l'air

Le type d'exposition au Mn le plus documenté est par inhalation de particules dans l'air. Le Mn est utilisé dans de nombreux alliages et se retrouve dans l'air de plusieurs milieux de travail. Pour cette raison, de nombreux travailleurs peuvent être exposés de cette façon.

1.4.1.1 chez les adultes

L'intoxication par exposition à des particules de Mn se trouvant dans l'air a été étudiée de façon exhaustive chez l'adulte (par ex.: Huang, Chu, Lu, Chen, & Calne, 1998; Racette et al., 2001). Le type de soudure, la ventilation et le degré de confinement sont des facteurs qui peuvent prédire le niveau d'exposition des travailleurs (Hobson, Seixas, Sterling, & Racette, 2011). Les premiers cas d'intoxication au Mn ont été décrits chez des travailleurs exposés à l'oxyde de Mn en France par James Couper en 1837 (Couper, 1837). Des symptômes tels un ralentissement moteur (bradykinésie), de la salivation, un trouble de la marche

(instabilité posturale) et un faciès neutre sont décrits. Une centaine d'années plus tard, Rodier (1955) rapporte l'apparition d'une symptomatologie comparable à celle de la maladie de Parkinson chez des ouvriers d'une mine de Mn: faiblesse musculaire, tremblement des extrémités, trouble de la marche, etc. Ce syndrome causé par une altération du fonctionnement du système nerveux central par le Mn s'appelle le manganisme.

Avant même d'observer les symptômes cliniques du manganisme, certains signes peuvent être observés comme un ralentissement moteur et de la vitesse de réponse, une augmentation des tremblements et des capacités olfactives, ainsi que des changements au niveau de l'humeur (Mergler & Baldwin, 1997). Par la suite, des symptômes comme la dystonie, la bradykinésie, la rigidité, des rétropulsions et un trouble de la marche peuvent être observés (Bowler, Koller, & Schulz, 2006; Sato, Ueyama, Arakawa, Kumamoto, & Tsuda, 2000). Ces symptômes peuvent même progresser après avoir cessé l'exposition professionnelle au Mn et des dommages neurologiques permanents peuvent en résulter (Huang et al., 1998; Nelson et al., 1993).

Une étude aux États-Unis a observé que la prévalence de la maladie de Parkinson serait plus élevée chez les soudeurs exposés au Mn que dans la population générale (Racette et al., 2005). Bien que le manganisme partage plusieurs symptômes moteurs avec la maladie de Parkinson, ces deux conditions auraient une neuropathologie différente. La maladie de Parkinson est caractérisée par une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance grise *pars compacta*, la présence de corps de Lewy (c.-à-d. accumulation anormale de protéines associées à certaines maladies neurodégénératives), la préservation du GP et la maladie répond habituellement au traitement à la levodopa. À l'inverse, la neuropathie induite par une intoxication au Mn est caractérisée par des dommages directs au GP, une hyperintensité T1 dans le

GP d'une image IRM, la préservation de la substance grise pars compacta, l'absence de corps de Lewy et elle ne répond pas au traitement à la levodopa (Pal, Samii, & Calne, 1999; Perl & Olanow, 2007). L'apparition des symptômes, dans le cas d'une intoxication au Mn, peut débiter à un âge plus précoce comparativement à la maladie de Parkinson (Cersosimo & Koller, 2006).

Bien que les symptômes moteurs dominent dans le manganisme, des altérations cognitives et psychiatriques y seraient aussi associées. Mergler et coll. (1994) ont montré qu'un groupe de travailleurs d'une usine de production d'alliage à base de Mn avait des résultats significativement plus bas que le groupe contrôle dans les tests évaluant les fonctions motrices, la flexibilité mentale et la perception olfactive. Les travailleurs affichaient aussi davantage de tension, de colère, de fatigue et de confusion. Une seconde étude rapporte des déficits plus élevés chez des travailleurs exposés au Mn pour les habiletés motrices, la vitesse de suivi visuomotrice, le traitement de l'information, la mémoire de travail, les habiletés verbales, la mémoire différée et les habiletés visuospatiales (Bowler, Gysens, et al., 2006). Bien qu'un profil neuropsychologique spécifique à l'intoxication au Mn ne semble pas encore tout à fait bien défini, des déficits cognitifs associés à une dysfonction du lobe frontal et des régions sous-corticales seraient impliqués (Klos, Chandler, Kumar, Ahlskog, & Josephs, 2006). De plus en plus d'études rapportent des déficits en mémoire de travail, une fonction cognitive impliquant le lobe frontal, chez l'homme (Bowler, Gysens, et al., 2006; Chang et al., 2010) et chez l'animal (Schneider et al., 2009). Dydak et coll. (2011) ont utilisé la spectroscopie par résonance magnétique et a observé une diminution de N-acétylaspartate (le métabolite le plus abondant dans le cerveau après le glutamate) dans le lobe frontal chez des soudeurs exposés au Mn, ce qui suggère une dysfonction neuronale dans cette région cérébrale. Une étude rapporte aussi un effet du Mn sur le cortex cingulaire antérieur impliqué dans différentes fonctions cognitives, mais aussi dans les fonctions émotionnelles (Chang,

Woo, et al., 2009). L'humeur serait d'ailleurs affectée chez les personnes qui souffrent d'une intoxication au Mn, probablement une conséquence de l'atteinte plutôt diffuse du Mn au cerveau. Des scores plus élevés d'anxiété, de nervosité, d'irritabilité, de confusion, de somatisation, de trouble émotionnel et d'hostilité ont été observés chez des travailleurs exposés au Mn (Bouchard, Mergler, Baldwin, Panisset, & Roels, 2007; Bowler, Gysens, et al., 2006; Bowler, Mergler, Sassine, Larribe, & Hudnell, 1999).

Comme décrit précédemment dans la section «1.2.1 Imagerie par résonance magnétique (IRM)», le Mn affecte l'intensité du signal du GP chez les travailleurs exposés à des particules de Mn dans l'air (E. A. Kim et al., 2007; Sato et al., 2000; Shin et al., 2007). Un index pallidal élevé serait aussi associé à une moins bonne performance à des épreuves de motricité fine (Shin et al., 2007). Certaines études se sont intéressées aux travailleurs asymptomatiques exposés au Mn. Ceux-ci rapportent une hyperintensité du signal dans le GP et un index pallidal plus élevé malgré l'absence de symptômes de manganisme (Jiang et al., 2007; Yim et al., 1998). Ces études suggèrent que l'examen de l'intensité du GP à l'aide de l'IRM pourrait être un biomarqueur permettant l'évaluation d'une exposition au Mn avant même l'apparition de symptômes de manganisme. Dans ce sens, l'étude de Kim et coll. (1999) suggère que l'augmentation du signal dans le GP refléterait une récente exposition au Mn, mais pas nécessairement le manganisme.

L'IRM fonctionnelle permet d'approfondir les liens entre les performances cognitives et l'activité neuronale. À notre connaissance, deux études d'IRM fonctionnelle se sont intéressées aux substrats neuronaux affectés lors d'une intoxication au Mn (Chang et al., 2010; Seo et al., 2016). Chang et coll. (2010) ont montré que des travailleurs exposés au Mn avaient une activation plus diffuse que les sujets témoins lors d'une tâche de mémoire de travail. Malgré ces différentes

activations, la performance entre les deux groupes lors de la tâche était similaire. Pour expliquer ces résultats, les auteurs suggèrent que les travailleurs exposés au Mn nécessitent davantage de ressources cérébrales pour compenser leurs déficits mineurs liés à la mémoire de travail. Cette compensation (l'activation cérébrale diffuse) permettrait aux travailleurs d'avoir une performance similaire aux sujets témoins lors de cette tâche. Dans la seconde étude, les soudeurs exposés au Mn avaient une performance plus faible à des épreuves évaluant les fonctions exécutives. Une plus faible activation principalement dans les régions préfrontale et pariétale inférieure du cortex avait aussi été notée (Seo et al., 2016).

Plus récemment, des chercheurs ont utilisé l'IRM structurelle afin d'explorer les différences de volumes de matière grise dans le cerveau (c.-à-d. analyse volumétrique) entre des travailleurs exposés au Mn et des sujets témoins (Chang et al., 2013). Ces chercheurs ont observé une diminution significative du volume du GP et de certaines régions cérébelleuses (c.-à-d. le noyau dentelé gauche et les noyaux cérébelleux) chez les travailleurs exposés. Cette diminution était aussi associée à une moins bonne performance à une tâche de motricité fine (*grooved pegboard*), au rappel immédiat et différé du *korean Auditory Verbal Learning Test*, à l'empan direct et à la fluence verbale. Ainsi, l'altération de certaines régions du cortex causée par l'exposition au Mn aurait un effet significatif sur la cognition et le comportement. Une étude de Kim et coll. (2011) ont investigué les altérations de la matière blanche en lien avec une exposition professionnelle au Mn. Ils ont trouvé une différence au niveau structurel dans le corps calleux ainsi que dans la matière blanche frontale. Les auteurs suggèrent que, suite à l'analyse des paramètres de l'imagerie par diffusion, cette différence pourrait être due à une démyélinisation des fibres de matières blanches dans ces régions du cerveau chez les sujets exposés. Une autre étude d'imagerie par diffusion suggère aussi des changements microstructurels dans le GP

associé à une exposition chronique à de faibles concentrations de Mn (Lee et al., 2016).

Enfin, des études de suivi ont été effectuées sur plusieurs cohortes de travailleurs pour évaluer les effets à long terme d'une intoxication au Mn après cessation d'exposition (Bouchard, Mergler, Baldwin, Panisset, Bowler, et al., 2007). Ceci permet de mieux comprendre si l'élimination de la source d'exposition peut mener à une amélioration au niveau fonctionnel. Une étude de cas en neuroimagerie a montré que les dépôts de Mn dans le GP disparaissent après cessation d'exposition (Nelson et al., 1993). L'étude portait sur un homme qui avait fait des travaux de soudure sur des rails composés d'un alliage riche en Mn, occasionnant une exposition élevée. Un examen d'IRM avait d'abord objectivé une hyperintensité dans le GP. Le participant fut réévalué 6 mois après avoir cessé d'être exposé au Mn. À ce moment, l'hyperintensité avait complètement disparu, suggérant la disparition des dépôts de Mn. Malgré cela, aucune amélioration notable dans les déficits moteurs et neuropsychiatriques n'a été rapportée, suggérant des dommages permanents au cerveau. Dans le même ordre d'idée, la plupart des études longitudinales sur l'exposition au Mn montrent une persistance des atteintes du système nerveux (Baldwin, Bouchard, Larribe, & Mergler, 2008; Bouchard, Mergler, Baldwin, & Panisset, 2008). Bouchard et coll. (2007) ont suivi des travailleurs exposés au Mn plusieurs années après que ceux-ci aient cessé d'être exposés au Mn. Ces travailleurs ont eu une évaluation neuropsychologique et psychiatrique alors qu'ils étaient encore exposés, suivi d'une autre évaluation similaire 14 ans après la fin de l'exposition. Il y avait initialement des différences significatives dans plusieurs tests entre les travailleurs et les sujets témoins (tâche motrice de Luria, empan numérique, épreuve de repérage de la lettre H, épreuve d'inhibition du stroop, les symptômes de dépression). Lors du suivi, seuls la tâche motrice de Luria et l'inventaire sur la confusion étaient significativement différents entre les travailleurs et les sujets

témoins. Ces résultats peuvent refléter une amélioration de certains déficits observés lors de l'évaluation initiale. Évidemment, il faut que davantage d'études approfondissent le sujet puisque la réversibilité des symptômes du manganisme n'est pas encore bien documentée.

1.4.1.2 chez les enfants et les adolescents

Plusieurs chercheurs se sont intéressés aux effets d'une exposition aux particules de Mn se trouvant dans l'air chez des enfants habitant à proximité de certaines usines ou de sites de déchets dangereux. Ces expositions sont souvent chroniques, mais jamais aussi excessives que chez individus exposés en milieu de travail. Ces enfants sont donc principalement asymptomatiques, c'est-à-dire qu'ils ne présentent pas de symptômes évidents de manganisme. Toutefois, plusieurs études épidémiologiques rapportent une association négative entre le Mn dans l'air et la performance d'enfants à certaines épreuves évaluant les capacités motrices, intellectuelles, cognitives et comportementales.

Nous savons donc que chez l'adulte, une exposition au Mn dans l'air peut causer un éventail de symptômes moteurs s'apparentant au Parkinson, ainsi que d'autres effets cognitifs et psychiatriques. Des effets moteurs ont aussi été répertoriés chez des enfants vivant à proximité de raffinerie ou d'industrie utilisant le Mn. En Ohio, le Mn dans le sang et dans les cheveux étaient associés à une plus grande instabilité posturale chez des enfants vivant à proximité d'une raffinerie de ferromanganèse (Rugless et al., 2014). Une plus faible performance à des épreuves de dextérité manuelle et de coordination motrice serait aussi associée à l'exposition au Mn chez des enfants et adolescents exposés à des émissions contenant du Mn provenant d'usines à proximité (Hernández-Bonilla et al., 2011; Lucchini et al., 2012). Le Mn dans l'air n'affecterait pas seulement les capacités motrices. Au Brésil, Menezes-

Filho et coll. (2009) rapportent que des enfants vivant à proximité d'usine de production d'alliage de ferromanganèse avaient une concentration élevée de Mn dans les cheveux. Dans une seconde étude, ils ont démontré que cette concentration élevée de Mn dans les cheveux, chez des enfants âgés de 6 à 12 ans, était associée négativement au QI, principalement au QI verbal (Menezes-Filho, Novaes Cde, Moreira, Sarcinelli, & Mergler, 2011). L'équipe de Wright et coll. (2006) a observé des effets semblables en lien avec l'arsenic et le Mn trouvés dans les cheveux d'enfants de 11 à 13 ans habitant près d'un site où se trouvent des déchets dangereux. Les enfants avec des concentrations élevées de Mn et d'arsenic dans les cheveux avaient aussi un QI plus bas et la différence était plus prononcée pour le QI verbal que le QI performance. Riojas-Rodriguez et ses collaborateurs (2010) ont observé un effet de l'âge et du sexe sur les conséquences d'une exposition au Mn sur le QI chez des enfants de 7 à 11 ans. En effet, l'association entre la concentration de Mn dans les cheveux et le QI total était significative chez les jeunes filles, mais quasi inexistante chez les filles plus âgées et chez tous les garçons. Les concentrations de Mn dans les cheveux seraient aussi associées à une plus faible performance en mémoire de travail (Épreuve de séquences de chiffres - Empan indirect), en traitement visuospatial (Épreuve des blocs du *Wechsler Adult Intelligence Scale* - III) et à une plus faible capacité d'inhibition (c.-à-d. augmentation du nombre de commissions dans une épreuve d'attention soutenue) (Carvalho et al., 2014). Sur le plan comportemental, une étude a observé une association entre l'exposition au Mn et une augmentation du nombre de problèmes de comportement externalisé et d'inattention. Cet effet était plus important chez les filles que chez les garçons (Menezes-Filho et al., 2014).

1.4.2 Exposition au Mn par l'eau potable

Comme expliqué précédemment, le Mn se retrouve naturellement dans les eaux souterraines et superficielles utilisées pour la consommation d'eau potable. L'origine du Mn dans l'eau peut aussi être anthropogénique, c'est-à-dire causée par les activités humaines. Un des premiers incidents d'intoxication au Mn par la consommation d'eau potable répertorié date de 1941 au Japon. Des centaines de batteries à piles sèches avaient été enterrées à proximité de puits d'eau pour la consommation, contaminant l'eau jusqu'à une concentration extrêmement élevée de 28 mg/L (Kawamura, Ikuta, Fukuzumi, Yamada, & Tsubaki, 1941). Les 25 patients examinés souffraient de différents symptômes, dont la léthargie, des tremblements et des troubles mentaux. Mise à part des cas comme celui de contaminations excessives au Mn, l'exposition au Mn par la consommation d'eau potable est habituellement une exposition à long terme et à de faibles concentrations.

1.4.2.1 chez les adultes

Les effets d'une exposition au Mn par l'eau potable chez les adultes sont peu documentés. Kondakis et coll. (1989) ont montré un lien entre l'augmentation de la concentration de Mn dans l'eau potable et une plus forte prévalence de signes neurologiques liés au manganisme ainsi qu'à une plus forte concentration de Mn dans les cheveux. Par contre, Vieregge et coll. (1995) n'ont trouvé aucun lien entre la concentration de Mn dans l'eau de puits et les habiletés motrices fines d'adultes exposés. Cette différence peut être due à plusieurs facteurs expérimentaux, comme le choix des tests utilisés ou le niveau d'exposition. Le manque de consensus et le peu d'études faites sur les adultes peuvent aussi être expliqués par le fait que cette population est moins vulnérable aux effets d'une exposition à de faibles concentrations que les enfants.

1.4.2.2 chez les enfants et les adolescents

Deux études de cas sur des filles âgées de 5 et 7 ans ont montré que la concentration élevée de Mn trouvé dans l'eau potable était liée à plusieurs symptômes se rapprochant du manganisme (Brna et al., 2011; Sahni et al., 2007). Des symptômes comme un trouble de la marche, des picas (c.-à-d. une tendance pathologique à consommer des substances non comestibles), une labilité émotionnelle et une carence en fer étaient aussi observés chez ces enfants. Chez les deux sujets, des images d'IRM ont permis d'observer une hyperintensité du signal T1 dans le GP. Il est aussi intéressant de noter que les autres membres de la famille des sujets n'ont pas développé de symptômes de manganisme. Ceci suggère qu'il pourrait exister une variabilité interindividuelle dans la vulnérabilité à l'intoxication au Mn. Il est toutefois possible d'argumenter que les déficits observés dans ces deux études n'étaient pas causés seulement par l'exposition au Mn, mais aussi par d'autres facteurs métaboliques et environnementaux.

Plusieurs études épidémiologiques se sont intéressées aux expositions à long terme sur de larges cohortes d'enfants exposés au Mn par la consommation d'eau potable. Des effets sur les capacités intellectuelles, cognitives et comportementales ont été observés.

L'étude faite au Québec de Bouchard et coll. (2011), qui sera détaillée dans la section «1.5 Étude initiale», fait partie des premières études épidémiologiques à avoir rapporté une association négative entre le Mn dans l'eau (moyenne = 98 µg/L) et le QI chez des enfants de 6 à 13 ans. Une différence de 6.2 points de QI distinguait les enfants provenant du quintile d'exposition (concentration de Mn dans l'eau) le plus élevé du plus faible. Des résultats similaires ont été notés dans une étude effectuée au Bangladesh. Les enfants, âgés de 10 ans, étaient exposés à des concentrations

moyennes de Mn dans l'eau plus élevées (793 $\mu\text{g/L}$). Ces concentrations de Mn étaient associées à une diminution du QI total, du QI verbal et du QI de performance (Wasserman et al., 2006). Les deux études précédentes observaient un effet plus important sur le QI de performance (évalué par les sous-tests non-verbaux) que sur le QI verbal. Notons que le QI total est souvent calculé en additionnant les scores standardisés des différents sous-tests utilisés pour évaluer le QI verbal et le QI de performance.

Le Mn ne semble pas affecter seulement le QI. Des études ont observé un effet sur certaines fonctions cognitives. Une seconde publication provenant de la cohorte québécoise suivie dans la présente thèse a montré que le Mn était associé à une plus faible performance lors d'épreuves évaluant la mémoire, l'attention et les fonctions motrices (Oulhote, Mergler, Barbeau, et al., 2014). Une étude récente a montré que, chez des enfants vivant en milieux ruraux, la concentration de Mn dans le sang était associée négativement avec la perception visuelle et la conscience phonologique. La concentration de Mn dans les cheveux était associée à une plus faible mémoire de travail, tandis que la concentration de Mn dans l'eau à de plus faibles capacités d'inhibition et de langage écrit (Nascimento et al., 2016). Des études au Bangladesh chez des enfants d'environ 10 ans ont montré un effet négatif de la concentration de Mn dans le sang sur le raisonnement perceptif et la mémoire de travail (Wasserman et al., 2011; Wasserman et al., 2016). En Chine, une étude a rapporté que les enfants exposés au Mn par la consommation d'eau contaminée par ce métal avaient des scores plus faibles en mémoire à court terme, en dextérité manuelle, en mémoire visuelle et en vitesse de traitement de l'information (He, Liu, Zhang, & Sun, 1994). Chez des enfants de 8 à 11 ans, une exposition à plus de 400 $\mu\text{g/L}$ était associée à une plus faible performance en mathématique (Khan et al., 2012). La diversité des résultats témoigne d'un manque de consensus sur ce qu'est le profil neuropsychologique d'enfants exposés au Mn par la consommation d'eau potable.

Plusieurs facteurs peuvent contribuer à ce manque de consensus à travers les études, dont le niveau d'exposition, l'exposition à d'autres contaminants ou leurs interactions avec le Mn dans le corps. Les facteurs sociodémographiques, l'intelligence et le niveau d'éducation de la mère, la stimulation cognitive à la maison et l'exposition à certains autres contaminants (p ex.: le fer et l'arsenic) sont habituellement pris en compte dans les modèles statistiques de ces études épidémiologiques.

Pour ce qui est des effets du Mn sur le comportement, une étude a observé une association entre la concentration de Mn dans l'eau et les problèmes de comportements internalisés et externalisés (Khan et al., 2011). L'effet était plus important pour les problèmes externalisés. Bouchard et coll. (2007) ont aussi rapporté une association positive entre la concentration de Mn dans les cheveux et le nombre de comportements externalisés (hyperactifs et oppositionnels). Récemment, Rahman et coll. (2016) ont étudié une large cohorte d'enfants du Bangladesh exposés à de fortes concentrations de Mn dans l'eau et ont montré que la concentration de Mn dans l'eau était associée à une augmentation du risque de problèmes de conduite chez les garçons. La concentration prénatale de Mn dans l'eau était toutefois associée à une diminution des risques de problèmes émotionnels toujours chez les garçons seulement. Chez les filles, le Mn dans l'eau était associé à une diminution des comportements prosociaux (c.-à-d. comportement de souci de l'autre qui passe par l'empathie). Oulhote et coll. (2014), pour sa part, n'a pas observé d'association entre l'exposition au Mn et les comportements hyperactifs. La différence entre les résultats de ces études peut être attribuée en partie au niveau d'exposition. En effet, les enfants dans l'étude de Oulhote (2014) étaient exposés à une concentration moyenne de Mn dans l'eau de 99 µg/L, alors que ceux de l'étude de Khan (2011) à une concentration moyenne de 889 µg/L. Dans l'article de Bouchard (2007), l'eau potable des participants provenait de deux puits ayant des concentrations moyennes respectives de 160 et de 610 µg/L. Les participants puisant leur eau du puits avec la

concentration de Mn la plus élevée avaient des concentrations de Mn dans les cheveux plus élevées. Dans l'étude de Rahman (2016), la médiane était de 339 $\mu\text{g/L}$ avec les concentrations au 5^{ième} et au 95^{ième} percentile se situant à 4 et 3203 $\mu\text{g/L}$. Ces différences de niveaux d'exposition entre les études peuvent expliquer une partie des divergences observées lorsque l'on étudie l'impact du Mn sur les fonctions cérébrales.

Peu d'études sur l'exposition au Mn chez les enfants ont utilisé un devis longitudinal. Ce type de devis permet d'abord d'observer l'évolution à long terme de l'effet du Mn sur les fonctions cérébrales des enfants exposés durant de longues périodes. Ensuite, il permet d'évaluer la possible réversibilité des effets négatifs observés advenant une diminution de l'exposition. Une étude a suivi une cohorte d'enfants au Bangladesh et les a évalués à la période prénatale, à 5 ans et à 10 ans pour évaluer le risque d'une exposition à de l'eau de puits contaminé au Mn (Rahman et al., 2016). C'est la première étude à regarder l'effet d'une exposition prénatale sur le développement des fonctions cognitives et intellectuelles. Les résultats de cette étude suggèrent des effets dépendant du sexe de l'enfant et des effets contrastants, positifs et négatifs, lorsqu'ils tiennent compte de l'exposition prénatale et postnatale. Les concentrations de Mn dans l'eau lors de la période prénatale et à 5 ans étaient associées à une augmentation des problèmes comportementaux. Il y avait aussi un effet négatif à 5 ans de la concentration de Mn dans l'eau sur la mémoire de travail, mais seulement pour les garçons. Curieusement, l'exposition prénatale au Mn (concentration de Mn dans l'eau) était associée positivement, chez les filles seulement, à tous les scores évaluant les capacités intellectuelles et cognitives (c.-à-d. QI total, compréhension verbale, raisonnement perceptif, mémoire de travail, vitesse de traitement de l'information). Ces résultats offrent une nouvelle perspective sur les effets du Mn en tenant compte de l'exposition prénatale, qui est une période critique pour le développement du cerveau. Au Bangladesh, Wasserman et coll. (2016) ont suivi une

cohorte d'enfants de 8 à 11 ans exposés à l'Arsenic et au Mn présents dans leur puits d'eau potable sur une période de 2.8 ans. Lors de l'évaluation initiale, une association négative significative a été observée entre la concentration de Mn dans le sang et la performance à une épreuve de mémoire de travail. Il y avait un effet similaire sur le QI, mais l'effet devenait non significatif dans le modèle statistique ajusté pour diverses variables de confusion (p. ex. : QI de la mère et scores de stimulation cognitive à la maison). Suite à l'installation de nouveaux puits permettant de diminuer le niveau d'Arsenic et de Mn, les chercheurs ont observé une légère amélioration de la mémoire de travail. Ces résultats sont forts intéressants, mais nous pouvons souligner certaines limitations à l'étude. D'une part, les concentrations d'Arsenic et de Mn dans l'eau ont été mesurées initialement, mais pas suite à l'installation des puits. L'ampleur de la réduction de leurs concentrations ne peut donc pas être examinée. D'autre part, rappelons que l'utilisation du Mn dans le sang comme biomarqueur d'exposition n'était pas recommandée parce qu'il représente davantage une exposition aiguë à court terme. Il est donc nécessaire de faire d'autres études longitudinales similaires sur les effets d'une diminution de l'exposition au Mn présent dans l'eau potable sur les fonctions cérébrales.

1.5 Étude initiale

Le projet de thèse présenté dans ce document vise à suivre la cohorte «Edu-Mango», dont les participants, des enfants d'âge scolaire, avaient initialement été recrutés par l'équipe de Maryse F. Bouchard et évalués entre 2007 et 2009. Ceux-ci étaient exposés à différentes concentrations de Mn provenant de l'eau potable de leur résidence. L'exposition au Mn avait été mesurée grâce à des échantillons d'eau du robinet, des échantillons de cheveux et des questionnaires sur la consommation d'eau permettant de faire une estimation de l'apport en Mn en tenant compte du Mn provenant de l'ingestion d'eau et de l'alimentation. Plusieurs épreuves standardisées

avaient été administrées pour l'évaluation des capacités intellectuelles et cognitives des enfants: *Wechsler Abbreviated Scale of the Intelligence* (WASI), le *California Verbal Learning Test for Children* (CVLT-C), les séquences de chiffres, le test de Santa Ana, le test du *Fingertapping* et l'épreuve du *Stroop*. Deux publications en ont résulté: Bouchard et coll. (2011) et Oulhote et coll. (2014).

Dans l'étude de Bouchard et coll. (2011), les données de 362 enfants âgés de 6 à 13 ans provenant de plusieurs communautés et exposés à différentes concentrations de Mn dans l'eau (Médiane = 34 µg/L; Étendue = 1 µg/L - 2700 µg/L) ont été analysées. Plusieurs variables de confusion ont été intégrées aux modèles statistiques, tels que le revenu familial, la concentration de Fer dans l'eau, la stimulation cognitive à la maison (HOME), la structure familiale (p ex.: parents biologiques ensemble ou séparés), ainsi que l'intelligence (évaluée par l'épreuve non-verbale des matrices de Raven) et l'éducation de la mère. La présence d'autres métaux a été considérée à l'aide d'analyses de sensibilité: le plomb, l'arsenic, le cuivre et le zinc. Les résultats de cette étude montrent qu'une augmentation des concentrations de Mn dans l'eau et dans les cheveux, ainsi que de l'estimation de l'apport en Mn provenant de l'ingestion d'eau seraient associées à une diminution du QI chez les enfants. Une différence de 6.2 de QI séparait les enfants exposés à des concentrations de Mn dans l'eau de 1 µg/L (quintile d'exposition le plus bas) de ceux exposés à 216 µg/L (quintile le plus élevé). L'association avec l'exposition au Mn serait plus importante pour le QI de performance que pour le QI verbal. D'autre part, les associations entre les différentes mesures d'exposition au Mn et le QI n'étaient pas toujours linéaires. L'association entre la concentration de Mn dans les cheveux et le QI était plus importante lorsque les concentrations de Mn étaient plus élevées. L'association négative entre le Mn dans l'eau et le QI était, pour ça part, assez linéaire. De plus, le Mn mesuré au robinet semble être un meilleur prédicteur du QI que l'estimation de l'apport en Mn provenant de l'ingestion d'eau. Des résultats différents ont été observés entre

l'estimation de l'apport provenant de l'ingestion d'eau et l'estimation provenant de l'apport alimentaire. L'estimation de l'apport en Mn provenant de l'ingestion d'eau, mais pas celui provenant de l'alimentation, était significativement associée à la concentration de Mn dans les cheveux. L'estimation de l'apport alimentaire en Mn n'était d'ailleurs pas associée au QI. Il est possible que ces estimations soient sujettes à des erreurs de mesure puisqu'elle se base sur des détails de l'alimentation rapportés par les participants et leurs parents. Bref, cette première étude rapporte qu'une augmentation de l'exposition au Mn provenant de l'eau potable est associée à une diminution du QI chez les enfants.

Dans la seconde étude de Oulhote et coll. (2014), une association négative a été rapportée entre les concentrations de Mn dans l'eau et dans les cheveux et les scores aux épreuves évaluant la mémoire, l'attention et les fonctions motrices. Ce modèle statistique contrôlait pour différentes variables de confusion: le revenu familial, la concentration de plomb dans l'eau, les scores de dépression, d'intelligence et d'éducation de la mère, ainsi que le sexe et l'âge de l'enfant. Une augmentation d'un écart type de concentration de Mn dans les cheveux (transformé en log 10) était associée à une diminution de 24% de l'écart type des scores de mémoire, de 25% de l'écart type des scores d'attention et ce, après avoir ajusté pour les covariables indiquées plus haut. Une augmentation d'un écart type de concentration de Mn dans l'eau (transformé en log 10) était associée à une diminution de 14% de l'écart type des scores de mémoire et légèrement associée à une diminution des scores des fonctions motrices. Les scores de mémoire et des fonctions motrices déclinaient de façon plus importante à des concentrations au-dessus de 100 et de 180 $\mu\text{g/L}$, respectivement. Le Mn dans l'eau n'était pas associé aux scores d'hyperactivité et d'attention.

Ces études ont été suivies de campagnes de sensibilisation auprès des participants afin de leur fournir les concentrations de Mn dans l'eau de leur résidence. Des recommandations sur les systèmes de filtration adéquats ont aussi été fournies. Ceci devait permettre aux participants les plus exposés de réduire leur exposition au Mn.

1.6 Objectifs et hypothèses de recherche

L'objectif général de cette thèse vise à étudier les effets du Mn sur le cerveau chez des enfants exposés par la consommation d'eau potable. Le présent projet consiste donc à faire le suivi de la cohorte «Edu-Mango» afin d'évaluer anatomiquement et fonctionnellement l'impact d'une telle exposition. Notons que puisque les participants ont été sensibilisés aux effets du Mn sur le cerveau et à leur propre exposition au Mn dans l'eau du robinet suite à l'étude initiale de Bouchard et al. (2011), certaines familles ont diminué leur niveau d'exposition en effectuant différents changements (p. ex. : déménagement et nouveau système de filtration). De plus, 3 municipalités ont ajouté un système de filtration au sable vert à leur aqueduc, diminuant ainsi les concentrations de Mn dans l'eau distribuée.

1.6.1 Article 1: Changes in water manganese levels and longitudinal assessment of intellectual function in children exposed through drinking water.

Le premier article est une étude épidémiologique permettant le suivi de la cohorte d'enfants évaluée dans l'article de Bouchard et coll. (2011) et Oulhote et coll. (2014). Les objectifs spécifiques sont:

- Évaluer les participants à l'adolescence (environ 4 années après l'étude initiale) à l'aide des mêmes épreuves standardisées pour évaluer le QI.

- Évaluer l'association entre l'exposition au Mn et le QI des adolescents.
- Utiliser une mesure de Mn dans l'eau potable permettant de refléter adéquatement l'exposition à long terme des participants.
- Investiguer les changements de niveau d'exposition au Mn des participants.
- Examiner ces changements d'exposition en relation avec de possibles changements de scores de QI entre l'évaluation initiale (Bouchard et al. 2011) et l'évaluation de suivi.

Puisque plusieurs participants seront exposés au Mn à des niveaux différents entre l'étude initiale et l'étude de suivi, nous avons envisagé quatre scénarios possibles. D'abord, les sujets peuvent être 1) exposés faiblement lors de l'étude initiale et de suivi, 2) exposés hautement lors de l'étude initiale et faiblement lors de l'étude de suivi (c.-à-d. diminution de l'exposition), 3) exposés faiblement lors de l'étude initiale et hautement lors de l'étude de suivi (c.-à-d. augmentation de l'exposition), et 3) hautement exposés lors de l'étude initiale et de suivi.

Les hypothèses de recherche sont:

- Le Mn dans l'eau aura un effet négatif similaire sur le QI à l'adolescence que durant l'enfance, tel que décrit dans Bouchard et coll. (2011).
- En ce qui concerne l'évaluation du changement du niveau d'exposition :
 - Pour les enfants faiblement exposés lors de l'étude initiale et de suivi, il n'y aura pas de changement dans les scores de QI.

- Pour les enfants hautement exposés lors de l'étude initiale et faiblement lors de l'étude de suivi (c.-à-d. diminution de l'exposition), il sera possible d'observer une amélioration des scores de QI.
- Pour les sujets hautement exposés lors de l'étude initiale et de suivi ou ayant augmenté leur exposition, il sera possible d'observer 1) aucun changement ou 2) une diminution des scores de QI.

1.6.2 Article 2: MRI pallidal signal in children exposed to manganese in drinking water.

Le second article permet d'examiner l'effet du Mn au niveau cérébral chez un sous-groupe de la même cohorte d'enfants québécois exposés au Mn par la consommation d'eau potable. Les objectifs spécifiques sont:

- Analyser les images IRM et évaluer l'intensité du signal IRM du GP chez les enfants davantage exposés au Mn.
- Examiner différentes mesures d'intensité du signal IRM, dont l'index pallidal.
- Évaluer l'association entre les mesures d'intensité du signal IRM du GP et les scores à des épreuves évaluant les fonctions motrices.

Les hypothèses de recherche sont:

- L'intensité du signal IRM dans le GP sera plus élevée chez les enfants davantage exposés au Mn par la consommation d'eau potable.
- Les mesures d'intensité du signal IRM n'utilisant pas la matière blanche frontale comme référence seront plus adéquates comme biomarqueurs d'imagerie.
- L'intensité du signal IRM dans le GP sera associée à la performance des enfants aux épreuves évaluant les fonctions motrices.

CHAPITRE II

Article 1 : Changes in water manganese levels and longitudinal assessment of intellectual function in children exposed through drinking water.

Article soumis et présentement en révision dans la revue NeuroToxicology.

Changes in water manganese levels and longitudinal assessment of intellectual
function in children exposed through drinking water.

Laurie-Anne Dion^{a,b}, Dave Saint-Amour^{a,b,c}, Sébastien Sauvé^d, Benoit Barbeau^e,
Donna Mergler^c, Maryse F. Bouchard^{b,c,f}.

^a Department of Psychology, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada.

^b Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montréal, Québec, Canada.

^c Centre for Interdisciplinary Studies in Biology, Health, Society and Environment (CINBIOSE), Université du Québec à Montréal, Québec, Canada.

^d Department of Chemistry, Université de Montréal, Québec, Canada.

^e Department of Civil, Geological and Mining Engineering, École Polytechnique de Montréal, Québec, Canada.

^f Department of Environmental and Occupational Health, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author :

Maryse F. Bouchard

Université de Montréal, Pavillon Marguerite d'Youville

Département de santé environnementale et santé au travail

C.P. 6128 Succursale Centre-Ville

Montréal (Québec) Canada

H3C 3J7

Phone : +1-514-343-6111 ext. 43231

Email : maryse.bouchard@umontreal.ca

Running title: Water manganese and adolescent's intellectual function

Competing financial interests' declaration: We have no financial interests to declare.

2.1 Abstract

Background: Manganese naturally occurs in groundwater and is suspected to be a neurotoxicant in elevated concentrations. We previously reported a cross-sectional study showing that drinking water Mn concentration was associated with lower IQ scores in primary school-age children.

Objective: We aimed to re-assess the relation between exposure to Mn from drinking water and IQ scores at adolescence. In addition, we investigated the change in Mn water exposure from childhood to adolescence in relation to change in IQ scores.

Methods: From the 380 children enrolled in the baseline study, 287 participated to this follow-up study (mean age, 13.7 years). Mn concentration was measured in home tap water (MnW) and children's hair (MnH). A time-averaged water Mn concentration (TAWMn) was calculated based on MnW at baseline and follow-up examinations, conducted in average 4.4 years apart. The relationships between Mn exposure indicators at the initial and follow-up examinations and IQ scores (Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence) at follow-up were assessed with linear regression analysis, adjusting for potential confounders. Furthermore, intra-individual differences in IQ scores between the two examinations were compared for children whose MnW remained stable, increased or decreased.

Results: Geometric means of MnW at follow-up and TAWMn were 14.5 and 22.5 $\mu\text{g/L}$, respectively. MnW measured at follow-up was associated with Performance IQ negatively in girls ($\beta = -2.8$, 95% confidence interval [CI] -4.8 to -0.8) and positively in boys ($\beta = 3.9$, 95% CI 1.4 to 6.4). TAWMn was associated with lower Performance IQ in girls only ($\beta = -3.1$, 95% CI -5.2 to -1.0). IQ scores were not significantly associated with MnH, although a similar trend as for MnW was

observed. Mn exposure was more strongly associated with Performance IQ than with Verbal IQ. For children whose MnW increased between baseline and follow-up, Performance IQ was significantly lower at follow-up (intra-individual difference, -2.4 points).

Conclusion: Higher MnW was significantly associated with lower Performance IQ in girls, whereas the opposite findings were observed in boys. These findings suggest long-term exposure to Mn through drinking water is associated differently with cognition in boys and girls.

Keywords: Manganese, intellectual quotient, neurotoxicity, water, children.

2.2 Introduction

Manganese (Mn), an essential element that occurs naturally in soil, surface and ground water, as well as plants, is suspected to be a developmental neurotoxicant (Grandjean & Landrigan, 2014). Cross-sectional epidemiological studies assessing cognitive functioning mainly in pediatric population have observed an association between Mn exposure from drinking water and poorer performance in intellectual quotient (IQ) scores at high water Mn levels (Wasserman et al., 2006), as well as at lower water Mn levels (Bouchard et al., 2011). Water Mn exposure was also associated with poorer memory, attention, motor functions (Oulhote, Mergler, Barbeau, et al., 2014), mathematics achievement scores (Khan et al., 2012), perceptual reasoning, working memory (Nascimento et al., 2016; Rahman et al., 2016; Wasserman et al., 2011; Wasserman et al., 2016), as well as behavior problems (Bouchard, Laforest, et al., 2007; Khan et al., 2011; Rahman et al., 2016). Although the studies described above varied greatly in terms of levels of exposure, and use of Mn biomarkers, they support the hypothesis that Mn exposure might adversely affect the developing brain.

Only one study examined the impact of reducing Mn exposure on children's cognitive functions. Wasserman and colleagues (2016) followed a cohort of 8 to 11 years-old Bangladeshi children exposed to arsenic and Mn in well-water within a period of 2.8 years between examinations. At baseline, examination showed significant association between blood Mn and poorer working memory. After reducing water arsenic and Mn levels by installing new wells, they observed no improvement in overall IQ scores, but there was a slight and non-significant improvement in working memory. However, the reduction of these trace elements in drinking water was not quantified and no sex-stratified analyses were done. More

study is needed on the impact of changes in exposure levels on children's cognitive or intellectual functions.

We previously reported that higher water Mn concentration was associated with lower Full Scale IQ scores in a group of school-age children aged between 6-13 years (Bouchard et al., 2011). In this study, children in the highest quintile of Mn concentration had Full Scale IQ scores lower by 6 points compared with those in the lowest quintile. The association between MnW and Full Scale IQ was stronger for girls than for boys. Hair Mn was also associated with lower Full Scale IQ scores. Both water and hair Mn concentrations were more strongly associated with decrements on the non-verbal tasks (i.e., performance IQ scores) than on the verbal tasks. The first objective of the present study was to re-assess the relation between water Mn concentration and cognition in this cohort at approximately 14 years of age. The second objective was to monitor changes in Mn concentration in participants' tap water and to investigate how it relates to change in IQ scores.

2.3 Methods

2.3.1 Study design and recruitment

Participants of the baseline epidemiological study in southern Quebec (Canada) carried out by Bouchard and colleagues in 2007-2009 were contacted for the present follow-up study, which was conducted in 2012-2013. Further details on selection and recruitment of the baseline study participants are reported elsewhere (Bouchard et al., 2011). Of the initial 380 participants (mean age, 9.3 years; standard deviation [SD], 1.8), 287 children (mean age, 13.7 years; SD, 1.8) participated in the follow-up study. Mean time elapse between baseline and follow-up examinations was 4.4 years (range, 4.0-5.2 years). The main reason for attrition was loss of contact with

participants (11%). Among participants that we kept contact with, the participation rate was 85%. For each participant, an informed written consent was obtained from a parent, along with a written assent from the adolescent. The research procedures were approved by the Sainte-Justine Hospital and Université du Québec à Montréal research ethics committees.

2.3.2 Mn measurements

The same procedures as in Bouchard and colleagues (2011) were used for collecting water and hair samples to ensure comparability of results between baseline and follow-up examinations.

We collected a water sample from the kitchen tap for every child enrolled in the study to measure Mn concentration in drinking water, as well as concentrations of other metals (iron, arsenic, and lead). The standardized tap water sampling procedure was: 1) open the tap for 5 min, 2) close and leave untouched for 30 min, and 3) collect first draw (Van den Hoven & Slaats, 2006). We added 0.15 mL nitric acid (50%) to the 50-mL water sample, which was then stored at 4°C. Mn was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

Mn concentration was measured in a hair sample (MnH) collected from the occiput of each child, cutting as close as possible to the root with surgical stainless steel scissors. We used 2 cm closest to the scalp for the following steps. Hair samples were washed and digested following the procedure described in Wright and colleagues (2006) and analysed by ICP-MS. A certified reference material was used to control the quality of analysis with every batch of digestions. Missing data ($n = 13$) occurred because of the following reasons: participant's refusal to give sample, short hair length, recently dyed hair and problems in laboratory analysis.

2.3.3 Time-averaged water Mn exposure

For each participant, one parent was interviewed to collect information on water supply to the house, including changes that occurred between the baseline and this follow-up study. For 31% of participants ($n = 88$), changes occurred to their water supply after the baseline study. From those participants, 44% ($n = 39$) moved, 41% ($n = 36$) reported a change in their domestic water treatment system and 15% ($n = 13$) were drawing water from a municipality that changed the water treatment system. Therefore, we used Mn water concentrations measured at baseline and follow-up examinations and calculated a time-averaged MnW (TAWMn) taking into consideration changes to water supply made in-between studies. TAWMn could not be calculated for only one participant whose MnW from the initial examination was missing. Figure 1 illustrates how TAWMn was calculated.

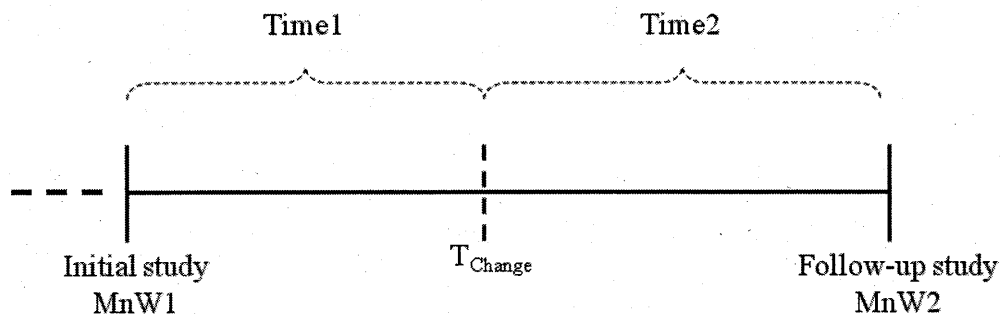


Figure 2.1 Calculation of the TAWMn. MnW1, Mn concentration at baseline; MnW2, Mn concentration at follow-up; T_{Change} , major changes in water supply; Time 1, number of months between initial examination and major change made to water supply; Time 2, number of months between major change to water supply and follow-up examination.

For participants for whom changes occurred to their water supply, we added MnW1 multiplied by Time 1 to MnW2 multiplied by Time 2, and divided the total by the total number of months between studies

$$([MnW1 * Time1] + [MnW2 * Time2]) / (Time1 + Time2)$$
. For participants whose water supply did not change, a mean of both MnW samples was calculated $([MnW1 + MnW2] / 2)$.

2.3.4 Assessment of IQ and potential confounders

The same standardized test as the baseline examination was used to assess general intellectual functioning, i.e., the Weschler Abbreviated Scale of Intelligence (WASI) (Wechsler, 1999). This test provides different scores: Full Scale IQ, Performance IQ (based on the subtests Block Design and Matrix Reasoning) and Verbal IQ (based on the subtests Vocabulary and Similarities). Four psychometricians, blinded to Mn concentration in children's drinking water, administered the WASI, but the same person performed all scoring. Unexpectedly, IQ scores correlated significantly with age when using the normative data provided by the test publisher (Wechsler, 1999), which are standardized for age. Since we aim to compare scores at different ages, the raw scores were thus standardized for age but using our own dataset. To do so, participants were divided into 4 equal groups based on age (Table 2.1). For each participant, a Z-score was calculated using the mean and standard deviation of its age group, which was multiplied by 15, and added 100 to yield an IQ score. The obtained standardized IQ scores did not correlate with age, as expected. We used the same procedure for IQ scores collected at the baseline examination to enable comparisons of IQ scores between examinations.

The following covariates were taken into account: child's age, sex, HOME score (at home cognitive stimulation), maternal nonverbal intelligence (assessed by the Raven Matrices Test), maternal education (4 groups: less than 11 years of education, 11 and more years, some college, some university), family income (10 levels, used as continuous variable), smoking during pregnancy (yes/no), alcohol consumption

during pregnancy (yes/no), as well as iron, arsenic, and lead concentration in drinking water. We conducted univariate analyses with each potential covariate. A covariate was included in the multivariate model if it was associated ($p < 0.2$) with IQ scores and at least one of the Mn exposure indicators. Using this strategy, the covariates selected to be included in the adjusted models were maternal nonverbal intelligence, maternal education and family income.

2.3.5 Statistical Analyses

MnW and TAWMn were log-transformed using a base 10 and MnH was log-transformed using a base 2 to correct the skewness of the data distributions. Regression models were used to analyze the relation between Mn exposure indicators (i.e., MnW, TAWMn, and MnH) and IQ scores assessed at the follow-up examination, adjusting for the potential confounders listed above. Partial R^2 were used to compare the proportion of unique shared variance explained by each Mn exposure indicator in adjusted regression models to give insight on which one would be the best predictor of IQ. We reported the interaction term for sex \times Mn exposure indicators in relation to the outcomes since previous studies suggested sex-specific associations with Mn exposure (Llop, Lopez-Espinosa, Rebagliato, & Ballester, 2013; Menezes-Filho et al., 2014; Rahman et al., 2016; Riojas-Rodriguez et al., 2010; Roels et al., 2012). Sex-stratified analyses were also used to examine such sex-specific associations. We conducted sensitivity analyses to assess the influence of additional adjustment for smoking and alcohol consumption during pregnancy. The relations between Mn exposure and IQ scores were represented using quintiles of Mn exposure indicators.

Analyses were also performed to investigate how changes in MnW between baseline and follow-up studies were related to changes in IQ scores. Furthermore, intra-

individual differences in IQ scores between the two examinations were compared for children whose MnW remained stable, increased or decreased. Therefore, participants were categorized into 4 groups using 25 $\mu\text{g/L}$ MnW as the cut-off concentration: 1) MnW < 25 both at baseline and follow-up; 2) MnW <25 $\mu\text{g/L}$ at baseline and \geq 25 $\mu\text{g/L}$ at follow-up; 3) MnW \geq 25 $\mu\text{g/L}$ at baseline and <25 $\mu\text{g/L}$ at follow-up; 4) MnW \geq 25 both at baseline and follow-up. This cut-off was chosen in order to have enough observations in each group. Within each of the 4 groups, non-parametric Wilcoxon signed rank tests for paired samples were used to analyze intra-individual changes in IQ scores between baseline and follow-up examinations. These non-parametric tests were used because of small sample sizes. The mean intra-individual Δ IQ (i.e., IQ score at follow-up - IQ score at baseline examination) between these 4 groups were compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test (because Levene homogeneity test showed uneven variances). Sex-stratified analyses were not performed because of the too small number of participants in each group. Sensitivity analyses were performed on the previous tests to evaluate the effect of the exclusion of participants with high variability of performance between examinations (difference of \pm 20 IQ points between examinations). P-values < 0.05 were considered as statistically significant.

2.4 Results

2.4.1 Descriptive statistics

Participants' characteristics and Mn levels in water and hair, as well as TAWMn are shown in Table 2.1. Seventy-eight percent of mothers had at least some college education, 64% had family income above \$50,000, and 99% of children were white. More details on the characteristics of this cohort are available in Bouchard and colleagues (2011).

Table 2.1 Participants' characteristics at follow-up examination and relation with water Mn concentration, time-averaged MnW and hair Mn concentration.

Characteristics	MnW			TAWMn			MnH		
	n (%)	GM ($\mu\text{g/L}$) ^a	p-value	n (%)	GM ($\mu\text{g/L}$)	p-value	n (%)	GM ($\mu\text{g/g}$)	p-value
Child									
Sex			0.85			0.56			0.69
Male	136 (47%)	14.9		135 (47%)	21.0		133 (49%)	0.7	
Female	151 (53%)	14.2		151 (53%)	24.0		141 (51%)	0.7	
Age (years)			0.77			0.27			0.47
10.5-12.1	72 (25%)	17.3		72 (25%)	31.5		68 (25%)	0.7	
12.11-13.5	69 (25%)	12.6		69 (25%)	16.5		75 (27%)	0.6	
13.51-15.04	71 (25%)	14.9		71 (25%)	22.3		64 (23%)	0.8	
15.07-18	72 (25%)	14.4		72 (25%)	23.1		67 (25%)	0.7	
HOME scores ^b			0.61			0.79			0.78
1-3.5	60 (21%)	13.8		60 (21%)	22.2		58 (21%)	0.7	
4-5	146 (51%)	16.2		146 (51%)	24.1		139 (51%)	0.7	
5.5-8	81 (28%)	12.4		80 (28%)	20.0		77 (28%)	0.7	
Family ^c									
Water source			< 0.001			< 0.001			0.65
Aqueduct	104 (54%)	24.5		104 (54%)	44.2		141 (52%)	0.7	
Private well	89 (46%)	7.7		88 (46%)	11.6		132 (48%)	0.7	
Family income			0.55			0.95			0.53
≤ Can\$ 50,000	68 (36%)	15.6		67 (35%)	23.0		99 (37%)	0.7	
> Can\$ 50,000	122 (64%)	12.9		122 (65%)	22.6		171 (63%)	0.7	

^aUnivariate analysis of variance and *t*-tests. ^bHOME score 1 for lower stimulation and 8 for higher stimulation at home ^cOne measure per family for MnW (*n* = 194) and for TAWMn (*n*=193) and one measure per child for MnH (*n* = 274)

At follow-up examination, tap water Mn ranged from 0.2 to 961 $\mu\text{g/L}$ (arithmetic mean, 57.6; geometric mean [GM], 14.5). Forty percent of children were exposed to MnW levels above the aesthetic Canadian guideline level of 50 $\mu\text{g/L}$ for MnW (Health Canada, 1979). About a third of participants had little change in MnW (change <10 $\mu\text{g/L}$, *n*=129 [34.1%]). We observed a decrease in MnW at follow-up for 28.3% of participants; it decreased by 10-50 $\mu\text{g/L}$ for *n*=47 (12.4%), by 50-100 $\mu\text{g/L}$ for *n*=25 (6.6%), and by more than 100 $\mu\text{g/L}$ for *n*=35 (9.3%). On the other hand, we observed an increase in MnW at follow-up (change > 10 $\mu\text{g/L}$) for 13.3% of participants.

Univariate analyses showed no association between MnW and child characteristics (i.e., sex, age, and HOME scores) or family characteristics (i.e., maternal nonverbal intelligence, maternal education, family income, smoking and alcohol consumption during pregnancy). A significant MnW difference was found between houses supplied from a private well than from a municipal aqueduct (GM, 7.7 and 24.5 $\mu\text{g/L}$, respectively; $p < 0.001$). Pearson correlations between MnW and other elements were 0.57 for iron, -0.30 for lead and 0.03 for arsenic. The TAWMn ranged from 0.2 to 962 $\mu\text{g/L}$ (arithmetic mean, 80.4; GM, 22.5 $\mu\text{g/L}$). TAWMn was not associated with characteristics of children or families, and was significantly different between types of water supply (private well, GM, 12.5 $\mu\text{g/L}$; aqueduct, GM, 39.7 $\mu\text{g/L}$; $p < 0.001$). Participants' MnH levels ranged from 0.1 to 12.6 $\mu\text{g/g}$ (arithmetic mean, 1.1; GM, 1.4 $\mu\text{g/g}$). Univariate analyses showed no association between MnH and characteristics of children, families, or type of water supply. However, MnH correlated with MnW at follow-up (r , 0.48; $p < 0.001$) and with TAWMn (r , 0.43; $p < 0.001$).

2.4.2 Mn exposure and IQ at follow-up examination

No significant relation between any of the three Mn exposure indicators (MnW, TAWMn, and MnH) and IQ scores, adjusting for covariates, was found when the entire group was analyzed. However, the interaction term sex \times MnW was statistically significant for Full Scale IQ ($p = 0.002$) and Performance IQ ($p < 0.001$), but not for Verbal IQ ($p = 0.18$). The terms of interaction for sex \times TAWMn and for sex \times MnH were also significant for Performance IQ ($p = 0.02$ and $p = 0.05$, respectively). Thus, sex-stratified analyses were conducted.

Table 2.2 presents unadjusted and adjusted changes in IQ scores for a 10-fold increase in MnW and TAWMn levels, and for a 2-fold increase in MnH levels in

boys and girls. Unadjusted models yielded similar results as adjusted models. Overall, more significant associations were observed in girls in comparison to boys. In the adjusted models in girls, higher MnW and TAWMn were significantly associated with lower IQ scores for Full Scale and Performance IQ, and borderline significantly associated with Verbal IQ ($p = 0.09$ for both MnW and TAWMn). These associations were slightly greater between TAWMn and Performance IQ where a 10-fold increase of TAWMn corresponded to a 3.1 decrease in IQ scores. Although MnH levels were also associated with lower Performance IQ, this result fell just short of significance (β , -1.1, 95% CIs, -2.4 to 0.1). On the other hand, analyses in boys revealed positive associations between Mn indicators and IQ scores. As such, higher MnW was significantly associated with higher IQ scores, with a stronger association for Performance IQ (β , 3.9, 95% CIs, 1.4 to 6.4). The associations between TAWMn and Performance IQ (β , 1.4, 95% CIs, -1.2 to 4.0) as well as between MnH and Full Scale (β , 1.3, 95% CIs, -0.3 to 3.0) and Performance IQ (β , 1.7, 95% CIs, -0.3 to 3.7) were not statistically significant. Sensitivity analyses showed that the inclusion of smoking and alcohol consumption during pregnancy in regression models did not change the results.

Table 2.2 Sex-stratified unadjusted and adjusted associations between Mn exposure indicators and IQ scores at follow-up examination. The association estimates represent the change in IQ scores per 10-fold increase for MnW and TAWMn levels, and per 2-fold increase for MnH (95% CIs).

Models	MnW	TAWMn	MnH
Unadjusted models			
Full Scale IQ			
Boys	2.4 (0.1 to 4.8)*	0.5 (-1.9 to 2.9)	0.9 (-0.8 to 2.6)
Girls	-2.1 (-4.0 to -0.3)*	-2.0 (-4.0 to 0.0)*	-0.7 (-1.8 to 0.5)
Performance IQ			
Boys	3.8 (1.1, 6.5)**	1.5 (-1.3, 4.4)	1.1 (-1.0, 3.1)
Girls	-2.9 (-5.0, -0.8)**	-2.7 (-4.9, -0.5)*	-1.2 (-2.5, 0.1)#
Verbal IQ			
Boys	1.1 (-1.7, 3.9)	-0.6 (-3.4, 2.3)	0.7 (-1.4, 2.7)
Girls	-1.4 (-3.6, 0.9)	-1.3 (-3.7, 1.2)	-0.1 (-1.6, 1.3)
Adjusted models^a			
Full Scale IQ			
Boys	2.4 (0.3 to 4.6)*	0.3 (-1.9 to 2.5)	1.3 (-0.3 to 3.0)
Girls	-2.3 (-4.1 to -0.6)**	-2.5 (-4.5 to -0.7)**	-0.8 (-1.9 to 0.3)
Performance IQ			
Boys	3.9 (1.4, 6.4)**	1.4 (-1.2, 4.0)	1.7 (-0.3, 3.7)#
Girls	-2.8 (-4.8, -0.8)**	-3.1 (-5.2, -1.0)**	-1.1 (-2.4, 0.1)#
Verbal IQ			
Boys	1.0 (-1.7, 3.7)	-0.7 (-3.5, 2.0)	0.9 (-1.1, 3.0)
Girls	-1.9 (-4.2, 0.3)#	-2.1 (-4.4, 0.3)#	-0.5 (-1.9, 0.9)

^aAdjusted for maternal nonverbal intelligence, maternal education, and family income.

** < 0.01, * $p < 0.05$, # $p < 0.1$

Figure 2.2 presents the relation between Performance IQ scores (adjusted for covariates) and quintiles of Mn exposure indicators. Only Performance IQ scores are illustrated since Verbal IQ scores were not significantly associated with Mn exposure (Table 2.2). Two distinct patterns are observed for boys and girls. Performance IQ scores rapidly decrease with increasing MnW levels in girls and rapidly increase in boys. There is a 7.0 Performance IQ points decrease in girls and 7.9 points increase in boys between the first MnW quintile (median, 0.7 $\mu\text{g/L}$) and the third quintile

(median, 18.5 $\mu\text{g/L}$). There was a steady decrease in Performance IQ for girls when looking across the range of TAWMn levels. Girls in the highest TAWMn quintile (median, 168.4 $\mu\text{g/L}$) scored 6.4 below those in the lowest quintile (median, 1.3 $\mu\text{g/L}$). Regarding MnH, there is an increase in Performance IQ points for boys and girls between the first and second quintile. The IQ scores are stable for boys in the three last quintiles and decrease for girls.

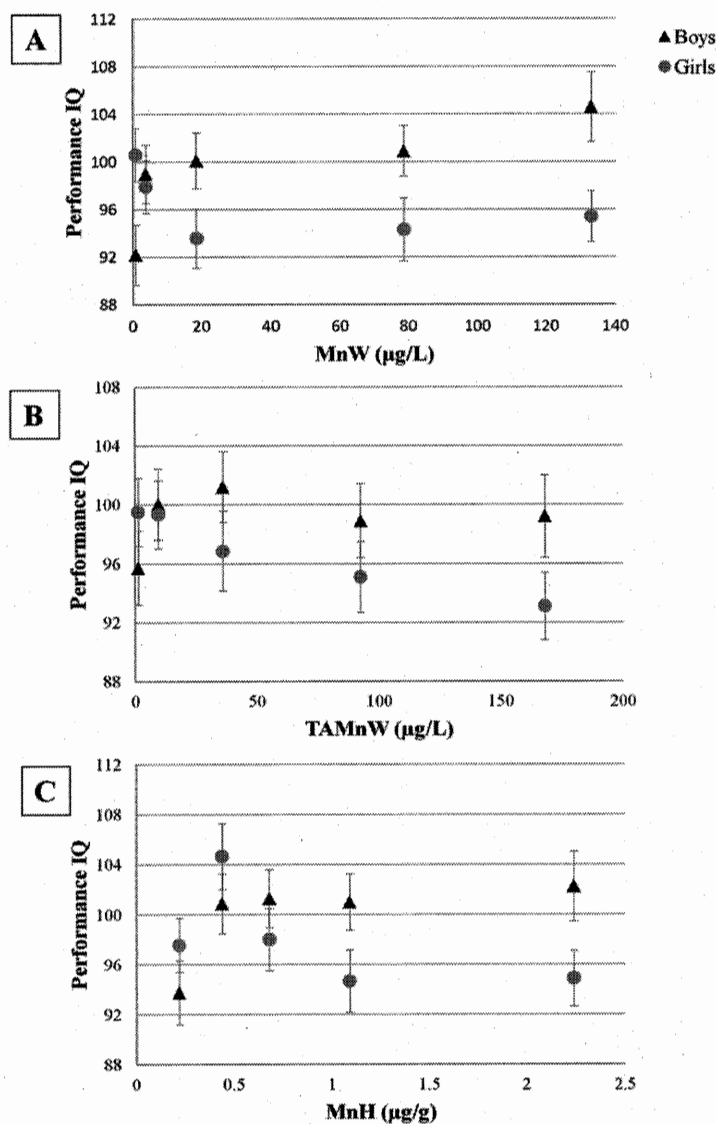


Figure 2.2 Mean Performance IQ (\pm SE) for all Mn exposure indicators, adjusted for covariates used in regression models (maternal nonverbal intelligence, maternal

education, family income). (A) IQ is plotted by median of MnW ($\mu\text{g/L}$) quintiles. The medians and ranges of MnW are as follows: 1st quintiles (lowest), 0.7 (0.1-2.0); 2nd, 3.7 (2.0-9.8); 3rd, 18.5 (9.8-50.6); 4th, 78.6 (50.6-95.0); and 5th (highest), 133.0 (99.9-960.7). (B) IQ is plotted by median of TAWMn ($\mu\text{g/L}$) quintiles. The medians and ranges of TAWMn are as follows: 1st quintiles (lowest), 1.3 (0.2-2.9); 2nd, 9.4 (3.1-18.5); 3rd, 36.1 (20.0-62.4); 4th, 92.5 (63.7-126.9); and 5th (highest), 168.4 (130.7-962.0). (C) IQ is plotted by median of MnH ($\mu\text{g/g}$) quintiles. The medians and ranges of MnH are as follows: 1st quintiles (lowest), 0.2 (0.1-0.3); 2nd, 0.4 (0.3-0.5); 3rd, 0.7 (0.5-0.8); 4th, 1.1 (0.8-1.4); 5th (highest), 2.2 (1.4-12.6).

Table 2.3 presents partial R^2 for the different Mn exposure indicators from adjusted regression models. In girls, MnW measured both at initial and at follow-up examinations predicted similarly well Performance IQ at follow-up (partial R^2 , 4.2 and 5.1%, respectively), and TAWMn also predicted Performance IQ similarly well (partial R^2 , 5.4%). In boys, MnW measured at follow-up predicted significantly Performance IQ at follow-up but not MnW measured at initial examination (partial R^2 , 5.4 and 0.8 %, respectively). MnH at initial examination did not predict Performance IQ at follow-up in either boys or girls, whereas MnH at follow-up tended to predict it similarly well in both sexes (partial R^2 , 2.3% for boys and girls).

Table 2.3 Partial R^2 for each exposure indicators, measured at initial and follow-up examinations, and Performance IQ measured at follow-up.

	MnW		TAWMn	MnH	
	Initial	Follow-up		Initial	Follow-up
Boys	0.1	7.0**	0.8	1.0	2.3 [#]
Girls	4.2*	5.1**	5.4**	1.4	2.3 [#]

Models adjusted for maternal nonverbal intelligence, maternal education, and family income. ** < 0.01, * p < 0.05, [#] p < 0.1

2.4.3 Long-term changes in Mn exposure and changes in IQ scores

All IQ scales measured at initial examination correlated positively with those measured at follow-up for all children, as well as in boys and girls separately (r values > 0.6 , $p < 0.001$). Levels of MnW concentration between examinations are shown in Table 2.4 according to four groups of children. Stable Mn concentration levels are illustrated by groups 1 and 4, whereas Mn changes are illustrated by groups 2 and 3. MnW exposure of group 2 (i.e., MnW < 25 $\mu\text{g/L}$ at baseline and ≥ 25 $\mu\text{g/L}$ at follow-up) increased of 81.9 $\mu\text{g/L}$ when comparing geometric mean of both examinations. MnW exposure of group 3 (i.e., MnW ≥ 25 $\mu\text{g/L}$ at baseline and < 25 $\mu\text{g/L}$ at follow-up) decreased of 121.5 $\mu\text{g/L}$ between examinations. As illustrated in Table 2.5, intra-individual differences in IQ scores showed that Performance IQ scores were significantly lower at follow-up than at baseline for children whose exposure to MnW increased (i.e., group 2: MnW < 25 $\mu\text{g/L}$ at baseline and ≥ 25 $\mu\text{g/L}$ at follow-up). The average decrease was 2.7 points (p -value for Wilcoxon test = 0.04). No significant difference was present between examinations for other IQ scales or in other groups. Full Scale, Performance and Verbal Δ IQ scores (i.e., the intra-individual difference in IQ calculated as IQ score at follow-up - IQ score at baseline examination) were not significantly different between groups (p -values for Kruskal-Wallis tests = 0.85, 0.53 and 0.58, respectively). Sensitivity analyses yielded overall similar results when excluding all children for whom a difference of more than 20 IQ points between examinations was noted.

Table 2.4 Description of the 4 exposure groups based on MnW levels measured at baseline and follow-up examination, categorized using a 25 $\mu\text{g/L}$ cut-off.

	n		n total	Baseline	Baseline MnW ($\mu\text{g/L}$)	Follow-up	Follow-up MnW	Change in MnW
	Boys	Girls	(%)	MnW group	GM (min-max)	MnW group	($\mu\text{g/L}$) GM (min-max)	between baseline and follow-up
Group 1	52	61	113 (40%)	< 25	2.4 (0.1-23.8)	< 25	2.4 (0.2-18.5)	=
Group 2	13	10	23 (8%)	< 25	3.3 (0.1-24.1)	≥ 25	85.2 (26.5-941.3)	\uparrow
Group 3	13	18	31 (11%)	≥ 25	125.4 (25.7-2700.7)	< 25	3.9 (0.2-18.3)	\downarrow
Group 4	57	61	118 (41%)	≥ 25	110.0 (25.9-1107.6)	≥ 25	83.6 (26.3-960.8)	=

= no change in exposure, \uparrow increased exposure, \downarrow decreased exposure.

Table 2.5 Mean IQ scores at baseline and follow-up examinations, and change in scores between examinations by change in MnW exposure groups. Group 1 (MnW < 25 µg/L at both examinations), group 2 (MnW <25 µg/L at baseline and ≥25 µg/L at follow-up), group 3 (MnW ≥25 µg/L at baseline and <25 µg/L at follow-up), and group 4 (MnW ≥ 25 µg/L at both examinations).

	Mean IQ at baseline (SD)	Mean IQ at follow-up (SD)	<i>p</i> -value ^a	Δ IQ: Mean intra- individual change in IQ (SD)
Full Scale IQ				
Group 1	101.4 (11.1)	100.3 (11.2)	0.26	-1.2 (9.1)
Group 2	102.8 (11.1)	101.0 (11.2)	0.14	-1.8 (5.6)
Group 3	100.8 (12.1)	99.2 (12.0)	0.38	-1.6 (8.2)
Group 4	100.1 (10.4)	99.7 (10.8)	0.55	-0.4 (8.6)
				<i>p</i> = 0.85 ^b
Performance IQ				
Group 1	101.5 (13.0)	100.3 (12.6)	0.16	-1.2 (11.4)
Group 2	104.5 (13.5)	101.8 (12.5)	0.04	-2.7 (7.8)
Group 3	98.4 (15.1)	98.3 (15.5)	0.81	-0.1 (12.7)
Group 4	100.2 (12.4)	99.7 (12.3)	0.84	-0.5 (11.1)
				<i>p</i> = 0.53 ^b
Verbal IQ				
Group 1	101.4 (12.7)	100.4 (13.8)	0.42	-1.2 (11.7)
Group 2	101.0 (10.2)	100.2 (12.6)	0.52	-0.8 (8.5)
Group 3	103.2 (14.1)	100.1 (12.3)	0.11	-3.1 (10.8)
Group 4	99.9 (13.6)	99.6 (13.3)	0.84	-0.3 (12.4)
				<i>p</i> = 0.58 ^b

^a Non-parametric Wilcoxon signed rank tests for paired samples to compare change in IQ scores between baseline and follow-up examinations within exposure groups. ^b *P*-value for non-parametric Kruskal-Wallis test between groups.

2.5 Discussion

Our results suggest that long-term exposure to Mn from drinking water might be associated with lower IQ in girls, whereas Mn was positively associated with IQ

scores in boys. Overall, associations were stronger for Performance IQ than for Verbal IQ. No significant association was found with MnH, although data suggested similar trends as for MnW, i.e., lower Performance IQ scores in girls and opposite findings in boys. Performance IQ decreased steadily across the range of TAWMn in girls. As such, MnW concentration and TAWMn proved to be both good predictors of Performance IQ in girls. These results support the hypothesis that long-term exposure to Mn through drinking water is associated with intellectual function in children and adolescents.

The stronger associations found with Performance IQ were also observed in our initial study (Bouchard et al., 2011). Wasserman and colleagues (2006) reported in 10 years-old children that MnW was negatively associated with IQ scores and that it explained a greater portion of variance for Full Scale and Performance IQ compared to Verbal IQ. This is interesting since Performance IQ includes perceptual reasoning (i.e., Matrix reasoning subtest), as well as spatial visualization and motor skills (i.e., Block design subtest). Using Magnetic Resonance Imaging (MRI), we previously reported in a subsample of those children enrolled in the present cohort associations between T1-weighted signal intensity of the globus pallidus, as well as enlargement of basal ganglia and decreased performance in motor skills (Dion et al., 2016; Lao et al., 2017). Negative associations between Mn exposure and motor skills have also been found in other studies of children exposed by waterborne (He et al., 1994; Oulhote, Mergler, Barbeau, et al., 2014) or airborne (Hernández-Bonilla et al., 2011; Lucchini et al., 2012) Mn particles. Thus, deficits in motor performance could explained in part the stronger associations between Mn exposure and Performance IQ.

Our longitudinal analysis of cognitive performance also suggests a decrease of Performance IQ in participants whose MnW exposure increased between

examinations. However, this result should be interpreted with cautious since few children saw an increase in their MnW. On the other hand, we have not observed improvement in IQ scores for participants whose exposure decreased. These results need to be replicated in subsequent studies aiming at investigating the impact of changes in Mn exposure on neurodevelopment.

Mn neurotoxicity on children has mostly been examined through cross-sectional studies. Only a single study followed a large cohort of children in Bangladesh from the prenatal period to 10 years of age to investigate the risks of exposure to Mn from contaminated well water (Rahman et al., 2016). The findings revealed an inverse association between postnatal MnW exposure at 5 years-old and working memory in boys. Although these results differ from the present study, our overall conclusions remain that the association between Mn exposure and children's brain functions seem to differ by sex.

Stratifying approaches to examine sex differences in environmental health studies is now highly recommended, especially for Mn (Mergler, 2012; Roels et al., 2012). Nevertheless, there is only a limiting number of human studies on sex-specific effect of Mn exposure on neurodevelopment. Most epidemiological studies have shown stronger adverse associations between Mn exposure and intellectual functions or behavior in girls compared to boys (Bouchard et al., 2011; Menezes-Filho et al., 2014; Riojas-Rodriguez et al., 2010), whereas one study have observed negative associations between Mn exposure and cognitive functions in boys (Rahman et al., 2016). In the present study, a sex-specific interaction was found for all Mn indicators and Performance IQ, with girls and boys showing contrasting associations (i.e., negative associations in girls and positive associations in boys). Of note, Mn exposure between boys and girls was not statistically different (Table 1). The discrepancy between sex-related manganese exposure profiles is thus likely due to

differences in Mn-related mechanisms. In adults exposed to Mn through diet, Finley and colleagues (1994) reported that men absorbed significantly less Mn but that it had a longer biological half-life than in women, which suggests that Mn metabolism differed between men and women. In accordance with this finding, experimental data show sex-dependent Mn sensitivity and neuron morphology changes following Mn exposure (Madison, Wegrzynowicz, Aschner, & Bowman, 2011; Moreno et al., 2009). Overall, these studies suggest that the effects of Mn exposure might differ as a function of sex, although the underlying mechanisms are not well known.

There are limitations to this study. Lack of data on maternal and early life Mn exposure precludes our ability to investigate whether exposure during critical development periods could better explain cognitive outcomes at adolescence. Our longitudinal design makes it only possible to examine if exposure during childhood has an impact on IQ at adolescence. Possible confounders or mediators that were not taken into account could impact our results. For example, metabolic disorders or genetics can alter absorption and elimination of Mn in the body (Chen, Parmalee, & Aschner, 2014; Sahni et al., 2007). Also, there was only a small number of participants whose Mn exposure increased or decreased significantly at follow-up, limiting the statistical power to investigate changes in level of exposure. Finally, hair Mn concentration was used as a biomarker of exposure, but it can be subject to exterior contaminations.

To our knowledge, this is the first study on Mn neurotoxicity to follow a cohort from childhood to adolescence. Although it is subject to limitations of epidemiological studies, its thorough longitudinal design made it possible to follow changes done to water treatment system in all households of participants. The level of attrition was low and all administrators were trained by those from the initial study to enable comparability across studies. It is the second study to observe the impact of changes

in Mn exposure on IQ scores. These findings will hopefully prompt future longitudinal study on Mn developmental neurotoxicity.

2.6 Conclusion

MnW and TAWMn were associated with lower Full-Scale and Performance IQ in girls, whereas MnW was associated with higher Performance IQ in boys. This sex-related divergent pattern of results has also been reported by previous studies. Also, for participants whose water Mn increased between studies, a decrease in their Performance IQ scores was observed. Overall, we found associations between water Mn exposure and intellectual development, but future studies are needed to replicate findings and to better understand underlying mechanisms of how Mn affects differently boys and girls in order to ensure adequate water quality guidelines.

2.7 Acknowledgments

We wish to acknowledge participants and families of participants who gave their time and help us carry out the study. We would like to thank Marie-Eve Brodeur for recruiting participants; her experience with this cohort was of great help. We are grateful for the *SickKids Foundation* for funding this study. The Canadian Institutes of Health Research (CIHR) funded the original epidemiological study (NRF-82899).

2.8 References

- Bouchard, M.F., Laforest, F., Vandélaç, L., Bellinger, D., Mergler, D. (2007). Hair manganese and hyperactive behaviors: Pilot study of school-age children exposed through tap water. *Environ Health Perspect*, 115, 122-127.
- Bouchard, M.F., Sauve, S., Barbeau, B., Legrand, M., Brodeur, M., Bouffard, T., et al. (2011). Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. *Environ Health Perspect*, 119, 138-143.
- Chen, P., Parmalee, N., Aschner, M. (2014). Genetic factors and manganese-induced neurotoxicity. *Front Genet*, 5, 265.
- Dion, L.-A., Bouchard, M.F., Sauvé, S., Barbeau, B., Tucholka, A., Major, P., et al. (2016). Mri pallidal signal in children exposed to manganese in drinking water. *NeuroToxicology*, 53, 124-131.
- Finley, J.W., Johnson, P.E., Johnson, L.K. (1994). Sex affects manganese absorption and retention by humans from a diet adequate in manganese. *Am J Clin Nutr*, 60, 949-955.
- Grandjean, P., Landrigan, P.J. (2014). Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The Lancet Neurology*, 13, 330-338.
- He, P., Liu, D., Zhang, G.Q., Sun, M. (1994). Effects of high-level manganese sewage irrigation on children's neurobehavior. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 28, 216-218.
- Health Canada. (1979). Manganese. Available: http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/manganese/manganese-eng.pdf [accessed 14 July 2016].
- Hernández-Bonilla, D., Schilman, A., Montes, S., Rodríguez-Agudelo, Y., Rodríguez-Dozal, S., Solís-Vivanco, R., et al. (2011). Environmental exposure to manganese and motor function of children in Mexico. *NeuroToxicology*, 32, 615-621.
- Khan, K., Factor-Litvak, P., Wasserman, G.A., Liu, X., Ahmed, E., Parvez, F., et al. (2011). Manganese exposure from drinking water and children's classroom behavior in Bangladesh. *Environ Health Perspect*, 119, 1501-1506.

- Khan, K., Wasserman, G.A., Liu, X., Ahmed, E., Parvez, F., Slavkovich, V., et al. (2012). Manganese exposure from drinking water and children's academic achievement. *NeuroToxicology*, 33, 91-97.
- Lao, Y., Dion, L.-A., Gilbert, G., Bouchard, M.F., Rocha, G., Wang, Y., et al. (2017). Mapping the basal ganglia alterations in children chronically exposed to manganese. *Scientific Reports*, 7.
- Llop, S., Lopez-Espinosa, M.-J., Rebagliato, M., Ballester, F. (2013). Gender differences in the neurotoxicity of metals in children. *Toxicology*, 311, 3-12.
- Lucchini, R., Guazzetti, S., Zoni, S., Donna, F., Peter, S., Zacco, A., et al. (2012). Tremor, olfactory and motor changes in italian adolescents exposed to historical ferro-manganese emission. *Neurotoxicology*, 33, 687-696.
- Madison, J.L., Wegrzynowicz, M., Aschner, M., Bowman, A.B. (2011). Gender and manganese exposure interactions on mouse striatal neuron morphology. *Neurotoxicology*, 32, 896-906.
- Menezes-Filho, J.A., Viana, G.F., Ferreira, J.R., Menezes Filho, J., Abreu, N., Nunes, L., et al. (2014). Elevated manganese exposure and school-aged children's behavior: A gender-stratified analysis. *Neurotoxicology*, 45, 293-300.
- Mergler, D. (2012). Neurotoxic exposures and effects: Gender and sex matter! Hänninen lecture 2011. *NeuroToxicology*, 33, 644-651.
- Moreno, J.A., Yeomans, E.C., Streifel, K.M., Brattin, B.L., Taylor, R.J., Tjalkens, R.B. (2009). Age-dependent susceptibility to manganese-induced neurological dysfunction. *Toxicological sciences*, 112, 394-404.
- Nascimento, S., Baierle, M., Göethel, G., Barth, A., Brucker, N., Charão, M., et al. (2016). Associations among environmental exposure to manganese, neuropsychological performance, oxidative damage and kidney biomarkers in children. *Environmental research*, 147, 32-43.
- Oulhote, Y., Mergler, D., Barbeau, B., Bellinger, D., Bouffard, T., Brodeur, M.-È., et al. (2014). Neurobehavioral function in school-age children exposed to manganese in drinking water. *Environmental Health Perspectives*, 122, 1343-1350.
- Rahman, S., Kippler, M.J., Tofail, F., Bölte, S., Hamadani, J., Vahter, M. (2016). Manganese in drinking water and cognitive abilities and behavior at 10 years of age: A prospective cohort study. *Environmental Health Perspectives*.

- Riojas-Rodriguez, H., Solis-Vivanco, R., Schilman, A., Montes, S., Rodriguez, S., Rios, C., et al. (2010). Intellectual function in mexican children living in a mining area and environmentally exposed to manganese. *Environ Health Perspect*, 118, 1465-1470.
- Roels, H.A., Bowler, R.M., Kim, Y., Claus Henn, B., Mergler, D., Hoet, P., et al. (2012). Manganese exposure and cognitive deficits: A growing concern for manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 33, 872-880.
- Sahni, V., Leger, Y., Panaro, L., Allen, M., Giffin, S., Fury, D., et al. (2007). Case report: A metabolic disorder presenting as pediatric manganism. *Environ Health Perspect*, 115, 1776-1779.
- Van den Hoven, T., Slaats, N. (2006). Lead monitoring. In: Analytical methods for drinking water, avances in sampling and analysis, (Quevaullier P, Thompson K, eds). Hoboken, NJ:Wiley.
- Wasserman, G.A., Liu, X., Parvez, F., Ahsan, H., Levy, D., Factor-Litvak, P. (2006). Water manganese exposure and children's intellectual function in araihazar, bangladesh. *Environ Health Perspect*, 114, 124-129.
- Wasserman, G.A., Liu, X., Parvez, F., Factor-Litvak, P., Ahsan, H., Levy, D., et al. (2011). Arsenic and manganese exposure and children's intellectual function. *Neurotoxicology*, 32, 450-457.
- Wasserman, G.A., Liu, X., Parvez, F., Factor-Litvak, P., Kline, J., Siddique, A., et al. (2016). Child intelligence and reductions in water arsenic and manganese: A two-year follow-up study in bangladesh. *Environmental Health Perspectives*, 124, 1114-1120.
- Wechsler, D. (1999). Wechsler abbreviated scale of intelligence (wasi). San Antonio, Texas:Harcourt Assessment.
- Wright, R.O., Amarasiriwardena, C., Woolf, A.D., Jim, R., Bellinger, D.C. (2006). Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese, and cadmium levels in school-age children residing near a hazardous waste site. *NeuroToxicology*, 27, 210-216.

CHAPITRE III

Article 2 : MRI pallidal signal in children exposed to manganese in drinking water.

Article publié dans la revue NeuroToxicology (Volume 53, p. 124-131, 2016).

MRI pallidal signal in children exposed to manganese in drinking water.

Laurie-Anne Dion ^{a, b}, Maryse F. Bouchard ^{b, c, d}, Sébastien Sauvé^e, Benoit Barbeau^f, Alan Tucholka^{g, h}, Philippe Major^b, Guillaume Gilbert^{h, i}, Laurent Létourneau-Guillon^h, Donna Mergler^c, Dave Saint-Amour^{a, b, c}.

^a Department of Psychology, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada.

^b Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montréal, Québec, Canada.

^c Centre for Interdisciplinary Studies in Biology, Health, Society and Environment (CINBIOSE), Université du Québec à Montréal, Québec, Canada.

^d Department of Environmental and Occupational Health, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

^e Department of Chemistry, Université de Montréal, Québec, Canada.

^f Department of Civil, Geological and Mining Engineering, École Polytechnique de Montréal, Québec, Canada.

^g BarcelonaBeta Research Center, Pasqual Maragall Foundation, Barcelona, Spain.

^h Department of Radiology, CHUM Notre-Dame Hospital, Montréal, Québec, Canada

ⁱ MR Clinical Science, Philips Healthcare, Markham, Ontario, Canada.

Corresponding author :

Maryse F. Bouchard

Université de Montréal, Pavillon Marguerite d'Youville

Département de santé environnementale et santé au travail

C.P. 6128 Succursale Centre-Ville

Montréal (Québec) Canada

H3C 3J7

Phone : +1-514-343-6111 ext. 43231

Email : maryse.bouchard@umontreal.ca

Running title: MRI in children exposed to manganese

Competing financial interests declaration: We have no financial interests to declare.

3.1 Abstract

Background: Manganese (Mn) can have neurotoxic effects upon overexposure. We previously reported poorer cognitive and motor development in children exposed to Mn through drinking water, suggesting possible neurotoxic effects from Mn in water. Hyperintensity in the globus pallidus (GP) on T1-weighted magnetic resonance imaging (MRI) indicates excessive brain Mn accumulation. Previous studies have reported GP hyperintensity related to Mn exposure in occupationally exposed individuals. However, no study has used MRI in children exposed to Mn in drinking water and who show no sign of overt intoxication.

Objective: To examine MRI signal intensity in the GP in children exposed to contrasted levels of Mn in drinking water.

Methods: We enrolled 13 children exposed to low Mn concentration in water and 10 children (ages 9-15 years) with high concentration (median of 1 and 145 $\mu\text{g/L}$, respectively). We calculated three MRI T1 indexes: i) standard pallidal index (PI) using frontal white matter as reference; ii) PI using pericranial muscles as reference; and iii) T1 relaxation time. Each MRI index was compared between exposure groups, and with respect to the estimated Mn intake from water consumption.

Results: The standard PI did not differ between Mn-exposure groups. However, children in the group with high water-Mn concentration had significantly lower pericranial muscles PI than those with lower exposure and, accordingly, higher T1 relaxation time. Mn intake from water consumption was not correlated with the standard PI, but was significantly

related to the pericranial muscles PI and T1 relaxation time. Motor performance was significantly lower in the high-exposure group.

Conclusion: We observed lower signal intensity in the GP of children with higher exposure to Mn from drinking water. This result stands in contrast to previous MRI reports showing GP hyperintensity with greater Mn exposure. Differences in exposure pathways are discussed as a potential explanation for this discrepancy.

Keywords : children, magnetic resonance imaging, manganese, neurotoxicity, pallidal index, water.

3.2 Introduction

Manganese (Mn) is an oligoelement essential for normal metabolism functions, such as defense against oxidative stress. However, overexposure to this metal can lead to neurotoxicity. Mostly reported in industrial workers exposed to Mn dust and fumes, overexposure to Mn can create a condition known as manganism, which consist of symptoms similar to Parkinson's disease, such as tremors, bradykinesia and gait disturbance (Huang et al., 1998; Rodier 1955). Although these studies were conducted in adults, exposure to airborne Mn in children and adolescents has recently been shown to be inversely associated with motor functions and, to a greater extent, cognitive functions (Carvalho et al., 2014; Hernandez-Bonilla et al., 2011; Lucchini et al., 2012; Menezes-Filho et al., 2014; Riojas-Rodriguez et al., 2010; Torres-Agustín et al., 2013).

Mn may also be present naturally in water, with the highest concentrations found in groundwater since it leaches from Mn-bearing minerals into the aquifers. More recently, a number of studies have examined potential neurotoxic effects in populations environmentally exposed to Mn from drinking water. These studies focused mainly on children because during development, immaturity of certain processes of metabolism and excretion makes children more vulnerable to neurotoxicity. Bouchard et al. (2011) studied 362 children from Quebec, Canada, and showed a negative association between Mn concentration in drinking water and intelligence quotient (IQ), as well as poorer performance of memory, attention and motor functions (Oulhote et al., 2014). Other studies conducted among children exposed to high concentrations of Mn in drinking water also reported lower IQ (Wasserman et al., 2006), as well as behavioural problems (Bouchard et al., 2007a; Khan et al., 2011), lower mathematics achievement scores (Khan et al., 2012), and reduced perceptual reasoning and working memory scores (Wasserman et al., 2011).

Due to its paramagnetic properties, the presence of Mn in the human brain can be observed and quantified with magnetic resonance imaging (MRI) (Mendonça-Dias et al., 1983). Mn shortens the water proton T1 relaxation time in brain tissue, resulting in a hyperintensity of the Mn-rich structures. MRI studies in individuals exposed to high concentrations of Mn have indicated that the preferential region of Mn accumulation is the globus pallidus (GP), as shown by hyperintensity of this structure (Dydak et al., 2011; Fitsanakis et al., 2006; Kim et al., 1999; Nelson et al., 1993; Park et al., 2007). For instance, in nonhuman primates exposed to airborne Mn, Park and colleagues (2007) reported detectable concentrations of Mn in the basal nuclei 8 months after exposure, with the most significant increase in the GP. Of note, Mn accumulation in the GP was dose-dependent and corresponded to the MRI T1 signal changes. Similar results have been reported by Dorman et al. (2006a, b).

The MRI brain marker most often used in studies on Mn exposure is the pallidal index (PI), which is calculated by dividing the mean intensity of the GP by the mean intensity of the subcortical frontal white matter (Krieger et al., 1995). The PI allows comparison of the GP signal intensity of multiple T1-weighted images by normalizing for intensity differences. However, some recent studies have raised concerns about this index, pointing to its high degree of variability and possible underestimation of the GP signal intensity due to the possibility of Mn accumulation in the frontal region (Dorman et al., 2006; Dydak et al., 2011; Guilarte et al., 2006; Long et al., 2014; Park et al., 2007). Thus, Guilarte et al. (2006) calculated a PI using a reference tissue outside the brain, i.e., the pericranial muscles, which was found to be more sensitive to Mn deposits in the GP than the standard PI in experimentally exposed macaques. As such, the authors reported that the signal intensity from pericranial muscles did not appear to change before or during Mn exposure, making it a more reliable denominator than the frontal white matter. Furthermore, quantitative T1 mapping images can be obtained from direct measurement of the

water proton T1 relaxation time, without any reference tissue, and can be used to assess the GP signal intensity (Choi et al., 2007). In welders with low-level Mn exposure, Mn accumulation was found to be assessed more sensitively with T1 relaxation time than by PI (Lee et al., 2015).

MRI has been used to assess signal intensity changes associated with Mn exposure in animal models (Krishna et al., 2014), occupationally exposed individuals (Long et al., 2014), and patients with liver failure (Maffeo et al., 2014) or long-term parenteral nutrition (Santos et al., 2013), two medical conditions associated with overexposure of Mn. In addition, MRI signal hyperintensity in the GP has been reported in two school-age girls who showed signs of manganism following consumption of well water with very high Mn concentrations (1700-2400 µg/L) (Brna et al., 2011; Sahni et al., 2007). No study has used MRI to assess subtle signs of brain alteration in children exposed to lower, commonly encountered levels of Mn in drinking water, and in whom no clinical symptoms of manganism (Mn poisoning) were present. This was the aim of the present study, in which school-age children exposed to contrasted levels of Mn in drinking water were examined with MRI to investigate the signal intensity of the GP using the following indicators: standard PI, pericranial PI and quantitative T1 relaxation time.

3.3 Participants and methods

3.3.1 Participants

For the present study, we enrolled a subsample of children from a larger cohort study investigating the association between exposure to Mn from drinking water and neurobehavioral deficits in school-age children. We previously reported the findings on 362 children from the province of Quebec (Canada) indicating Mn exposure from

drinking water was associated with cognitive deficits (Bouchard et al., 2011; Oulhote et al., 2014). This epidemiological study was carried out in 2007-2009. For the present MRI investigation, carried out in 2010-2012, we selected children based on the concentration of Mn in the tap water of their residences, which was measured in the initial study (Bouchard et al., 2011). However, we excluded families who had moved, or for whom the source of drinking water or water treatment changed after the initial study. In addition, we excluded children with MRI contraindication (e.g., having orthodontic devices, magnetic implants, etc.). Also, because the MRI examination was done in Montreal, many parents of the eligible children who lived far away (1.5 to 2 hours drive) refused to participate. We succeeded in enrolling 13 children with low and 10 children with high Mn concentration in their drinking water (< 30 and >100 $\mu\text{g/L}$, respectively). Participant were aged between 9 to 15 years (mean = 12.2 years). An informed written consent was obtained from a parent, along with written assent from the child. The research procedures were approved by the Sainte-Justine Hospital, Notre-Dame Hospital and Université du Québec à Montréal research ethics committees.

3.3.2 Mn exposure indicators

For every child enrolled in the study, we collected a water sample from their kitchen tap. When a point-of-use filter (filter attached to the tap) was present in the child's kitchen, we also collected a sample of water filtered with it (which was the case for 2 children). The same procedure as in Bouchard et al. (2011) was applied to standardize tap water sampling: 1) open the tap for 5 min, 2) close and leave untouched for 30 min, and 3) collect first draw. We added 0.15 mL nitric acid (50%) to the 50-mL water sample, which was then stored at 4°C. Mn was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

At the time of the MRI testing, we documented water consumption with a questionnaire administered by an interviewer to the child with the parents' help. The questionnaire addressed the amount of water ingested directly (i.e., daily volume of water drunk), as well as the amount of water incorporated in food and drink preparations (Bouchard et al., 2011). For each use (e.g., drinking, cooking), the water source was also documented; that is, tap water, tap filtered with a pitcher, tap with an attached filter, and bottled water. For each of these sources, the amount consumed per month was multiplied by the measured or estimated concentration of Mn. The Mn intakes from each source were added and then divided by the child's weight, yielding a total Mn intake in $\mu\text{g}/\text{month}/\text{kg}$.

3.3.3 MRI measurements

MRI data were acquired using a 3 T Philips Achieva X system. An 8-channel phased-array head coil was used for signal reception. Head motion was minimized using cushions. Different image types were collected: T1-weighted images, quantitative T1 maps, and quantitative T2* maps. T1-weighted images were acquired using a 3D spoiled gradient-echo with inversion recovery preparation (Repetition Time (TR) = 8.1 ms, Echo Time (TE) = 3.7 ms, Inversion Time (TI) = 1005 ms, acquisition matrix = 240 x 240 x 160, resolution = 1 mm x 1 mm x 1 mm, SENSE factor = 1.5). Sequence duration was 7.5 minutes. Regarding the quantitative T1 mapping, a 3D spoiled gradient-echo sequence with inversion recovery preparation was acquired (TR = 7.7 ms, TE = 3.7 ms, acquisition matrix = 230 x 230, slices = 60, resolution = 1 mm x 1 mm x 2 mm, SENSE factor = 2, axial orientation). Variable inversion times (100, 400, 900, 1400 and 1900 ms) were used in order to quantify T1 relaxation time. Sequences lasted 3.33 minutes per TI. Subject motion between each acquisition was minimized by applying rigid-body registration prior to the calculation of the T1 relaxation time. Whole-brain quantitative T1 maps were

computed from this acquisition using the fitting method described by Wright et al. (2008). This acquisition was used for T1 relaxation time (ms) measurement. It should be noted that higher T1 relaxation time corresponds to lower signal intensity in T1-weighted images. Quantitative T2* mapping was performed using a multi-echo, 3D spoiled gradient-echo sequence (TR = 61 ms, six echoes with TE = 6.2, 15.2, 24.2, 33.2, 42.2 and 51.2 ms, acquisition matrix = 224 x 224, slices = 65, resolution = 1 mm x 1 mm x 2 mm, SENSE factor = 2, axial orientation). Acquisition time was 7.3 minutes. Whole-brain T2* maps were calculated from this acquisition by performing a nonlinear mono-exponential regression of the signal as a function of the echo time. Quantitative T1 and T2* maps were transformed to the same space prior to segmentation by rigidly registering the images from the first echo of the T2* mapping sequence to the reference images of the T1 mapping sequence and then applying the same geometrical transformation to the T2* maps. All registration steps were performed using SPM8 (Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm). Two PIs were calculated: The standard PI and the pericranial muscle PI. For this reason, regions of interest (ROI) were defined manually and included bilateral GP, frontal white matter and pericranial muscles in T1-weighted images (see Figure 3.1).

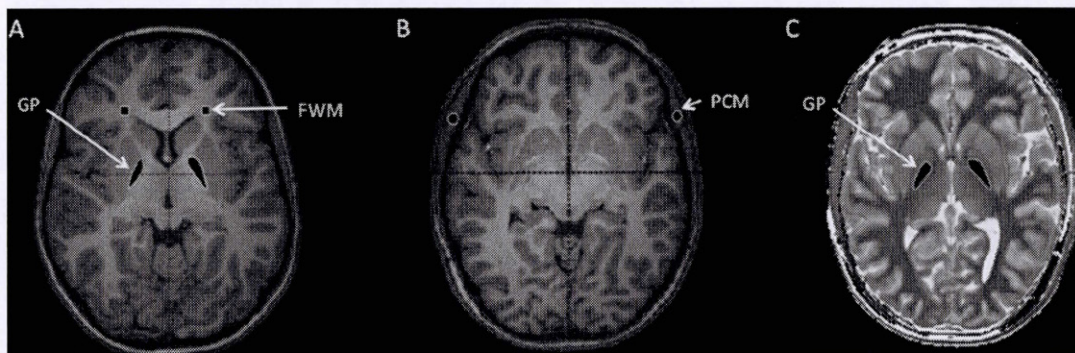


Figure 3.1 Regions of interest (ROIs) on a T1-weighted magnetic resonance image (A and B) and a quantitative T1 map (C). FWM: frontal white matter; GP: globus pallidus; PCM: pericranial muscles.

For T1 relaxation time (ms), only bilateral GP was defined as a ROI and segmented from the computed quantitative T1 maps to obtain the average T1 relaxation time. One researcher, (L.A.D.), blind to the exposure levels, manually segmented all ROIs. All segmentations were performed using ITK-snap 2.1.4-rc1 software (Yushkevich et al., 2006).

For the standard PI, references in subcortical frontal white matter were extracted from both hemispheres (total volume = 16 mm^3). Anatomical references were used to increase homogeneity of voxel selection across subjects: The dorsal limit of the GP and the tip of the putamen on the axial plane. For the pericranial PI, a sample of voxels was extracted from bilateral pericranial muscles, more specifically the temporalis muscles (total volume = 10 mm^3). They were also produced with the same anatomical references on axial planes: The rostral part of the temporal lobe and the most ventral section of the GP. To compute the PIs, the mean intensity of the GP was then divided by the mean intensity of the reference of interest (i.e., frontal white matter or pericranial muscles) multiplied by 100.

The T1-weighted image for one participant was discarded due to image artefacts during acquisition; the quantitative T1 map was however artefact free and thus kept for T1 relaxation time analyses. The validity of the PIs was first assessed to rule out possible bias in the manual segmentation of ROIs performed by the main rater (L.A.D.). Segmentation on T1-weighted images was completed by a second rater for 7 randomly selected participants (i.e., approximately 30% of the sample) to evaluate inter-rater agreement. The standard PI showed high reliability, with a Cronbach's α of 0.84. It was lower for the pericranial muscles PI (0.65); this is likely related to the higher variability of signal intensity in pericranial muscles, which are small structures, offering limited space to sample homogenous voxels. However, the

segmented ROIs of the pericranial muscles PI, when taken separately, showed a very high reliability: 0.99 and 0.87 for GP and pericranial muscles, respectively.

3.3.4 Fine motor function assessment

Scores from three motor tasks collected in the previous epidemiological study (Bouchard et al., 2011) were used for correlation analyses with the MRI measures. The first task was the Santa Ana Pegboard Test from the Neurobehavioral Core Test Battery developed by the World Health Organisation (WHO Office of Occupational Health, 1986), which counts the total turned pegs in a time limit of 60 s, providing a measure of hand dexterity and coordination. The second task was the finger-thumb task, which has been shown to be sensitive to Mn exposure (Zoni et al., 2007; Lucchini et al., 2012), and which consists of touching the thumb to each finger sequentially as quickly as possible for 10 s. Finally, the third task was the finger tapping, which assesses motor control, where the participant is asked to press a button with its index as quickly as possible for 10 s. Hernandez-Bonilla and colleagues (2011) showed an inverse association between blood Mn and motor performance in this task.

3.3.5 Statistical analyses

Because IQ is associated with brain morphology (e.g., Suzanne et al., 2011), we first verified whether children in the two exposure groups had comparable full scale IQ scores, using scores from the Weschler Abbreviated Scale of Intelligence administered during the initial study (Bouchard et al., 2011). Likewise, we compared differences between the two groups in cognitive stimulation at home, assessed using a modified version of the short-form HOME (Home Observation for Measurement of

the Environment) questionnaire (Bradley et al., 2001). The proportion of boys and girls in each group was examined using a Chi-square test.

Because of the small sample size, non-parametric Mann-Whitney U tests were used to compare the dependent variables (MRI and neurobehavioral measurements) between low and high Mn exposure groups. In addition, correlations between the Mn intake from water consumption and the outcomes were analyzed using non-parametric (Spearman Rho rank) and parametric (Pearson) tests. Indeed, Mn intake varied widely between children from a given exposure group because of the variations in the amount of water consumed. Although the sample size was too small to adequately adjust for covariates, we nonetheless did a sensitivity analysis with multiple regressions controlling age and sex. The statistical analyses were performed using SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). A significance level (alpha) of 0.05 was chosen.

3.4 Results

3.4.1 Exposure to Mn from water

At the time of MRI testing, drinking water Mn concentration from the children in the low-exposure group ranged from 0.2 to 27 $\mu\text{g/L}$ (median = 0.9; SD = 9) and those in the high-exposure group ranged from 103 to 264 $\mu\text{g/L}$ (median = 145; SD = 54). Children from the two exposure groups were comparable in terms of age, sex, HOME scores, and full-scale IQ scores (Table 3.1). The Mn concentration in the children's drinking water collected at the time of MRI testing was very highly correlated with that collected during the initial study (Spearman correlation, $r_s = 0.8$, $p < 0.001$).

Table 3.1 Participant's characteristics and water Mn exposure indicators for children in the low and high Mn exposure groups.

Characteristics	Low Mn exposure group			High Mn exposure group			Group comparison <i>p</i> -value
	<i>n</i>	Mean	SD	<i>n</i>	Mean	SD	
Age at time of testing	13	12.5	1.3	10	11.9	1.9	0.5 ^a
IQ score	13	101.3	9.1	10	105	10.8	0.6 ^a
HOME score	13	4.5	0.9	10	3.8	0.9	0.1 ^a
Sex (% boys)		39			40		0.6 ^b
Mn concentration in drinking water (µg/L)	13	0.9 ^c	9	10	145 ^c	54	<0.001 ^a
Mn intake from water consumption (µg/month/kg)	13	0.6 ^c	0.6	10	58 ^c	87	<0.001 ^a

SD: Standard deviation.

^a Mann-Whitney *U* test.

^b Chi-square test.

^c Median.

3.4.2 T1 signal intensity

As shown in Figure 3.2, the standard PI was not significantly different between the high- and low-exposure groups (mean ranks = 10.8 and 12.9, respectively; $U = 53$, $p = 0.5$). However, the pericranial muscles PI was significantly different, with the high-exposure group having lower signal intensity than the low-exposure group (mean ranks = 8.2 and 14.9, respectively; $U = 27$, $p = 0.02$). Consistent with these results, the T1 relaxation time of the GP tended to be longer in the high-exposure group than the low-exposure group (mean ranks = 15.0 and 9.7, respectively; $U = 35$, $p = 0.07$). Indeed, higher T1 relaxation time corresponds to lower signal intensity in T1-weighted images.

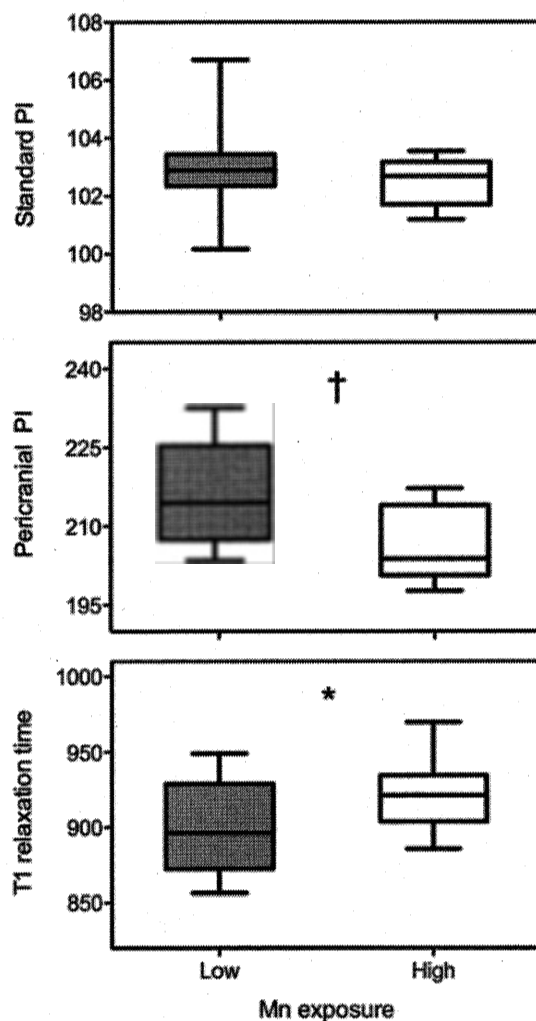


Figure 3.2 Distribution of MRI indices for children in the low and high water Mn exposure groups ($n = 13$ and 10 , respectively). The boxplots depict the minimum, 25th 50th, 75th percentiles, and maximum value. † $p < 0.1$; * $p < 0.05$.

In accordance with these results, Mn intake from consumption of water was not significantly correlated with the standard PI either for nonparametric ($r_s = -0.26$, $p = 0.23$) or parametric ($r = -0.19$, $p = 0.38$) analyses. However, a significant correlation was found between Mn intake and pericranial muscles PI ($r_s = -0.42$, $p = 0.04$; $r = -0.42$, $p = 0.048$) and T1 relaxation time ($r_s = 0.45$, $p = 0.03$; $r = 0.49$, $p = 0.017$). Scatterplots are shown in Figure 3.3. As a sensitivity analysis, we adjusted these

analyses for sex and age with multiple regressions, and this resulted in findings very similar to the univariate analyses. There was a significant association with the pericranial muscles PI (β for a 10-fold increase in Mn intake = -0.55, $p = 0.003$) and T1 relaxation time ($\beta = 0.43$, $p = 0.04$), but not with standard PI ($\beta = 0.07$, $p = 0.3$).

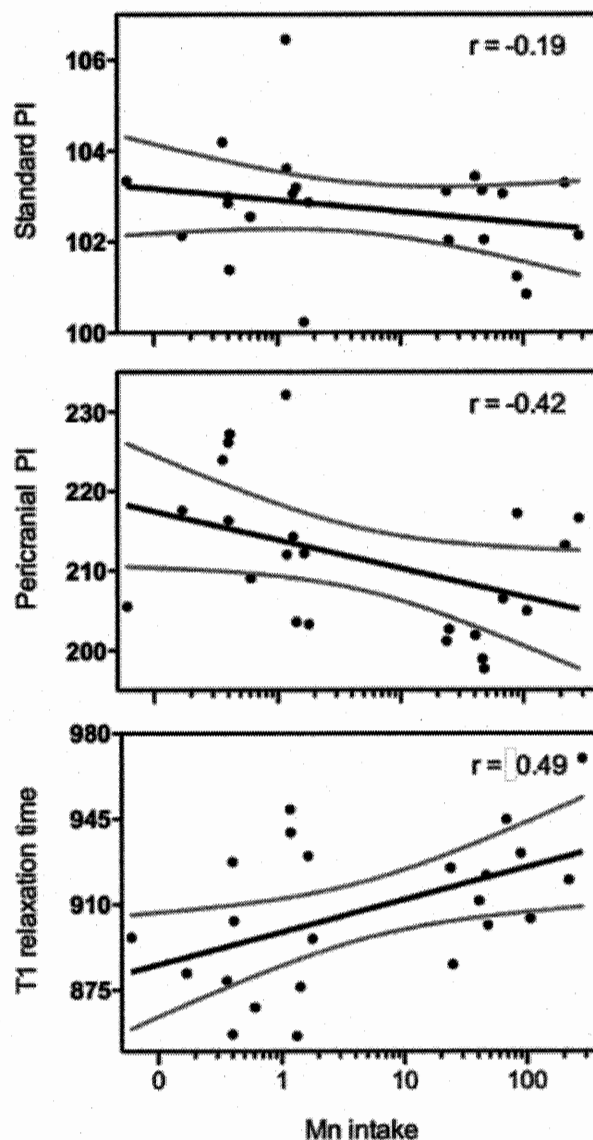


Figure 3.3 Scatterplot for Mn intake from water consumption ($\mu\text{g/month/kg}$) and MRI indices. Regression slopes and 95% confidence intervals are also shown.

3.4.3 Fine motor function

Performance on three motor tasks was examined as a function of Mn exposure. For each task, scores measured from both hands were averaged for statistical analyses. The high-exposure group was slower than the low-exposure group in the finger-thumb (mean ranks = 8.45 and 14.73, respectively; $U = 29.5$, $p = 0.03$), Santa Ana (mean ranks = 8.1 and 15, respectively; $U = 26$, $p = 0.02$), and finger tapping tests (mean ranks = 11.27 and 12.95, respectively; $U = 55.5$, $p = 0.56$), although the result from the latter was not significant. The correlation between Mn intake and the finger-thumb fell just short of significance ($r_s = -0.39$, $p = 0.06$), whereas the correlation with the Santa Ana test reached significance ($r_s = -0.45$, $p = 0.03$). Parametric (Pearson) correlations revealed very similar results, both for the finger-thumb task ($r = -0.41$, $p = 0.05$) and the Santa Ana task ($r = -0.48$, $p = 0.02$). Interestingly, the T1 relaxation time was significantly correlated with finger-thumb ($r_s = -0.47$, $p = 0.03$; $r = -0.55$, $p = 0.006$) and Santa Ana ($r_s = -0.49$, $p = 0.02$; $r = -0.57$, $p = 0.005$) scores. No significant correlation was found for finger tapping. Scatterplots are shown in Figure 3.4. The correlations between T1 relaxation time and finger-thumb and Santa Ana scores were also tested with multiple regressions as a sensitivity analysis to control for sex and age. Results revealed that the association were still significant after adjustments both for the finger-thumb ($\beta = -0.37$, $p = 0.036$) and the Santa Ana ($\beta = -0.27$, $p = 0.032$).

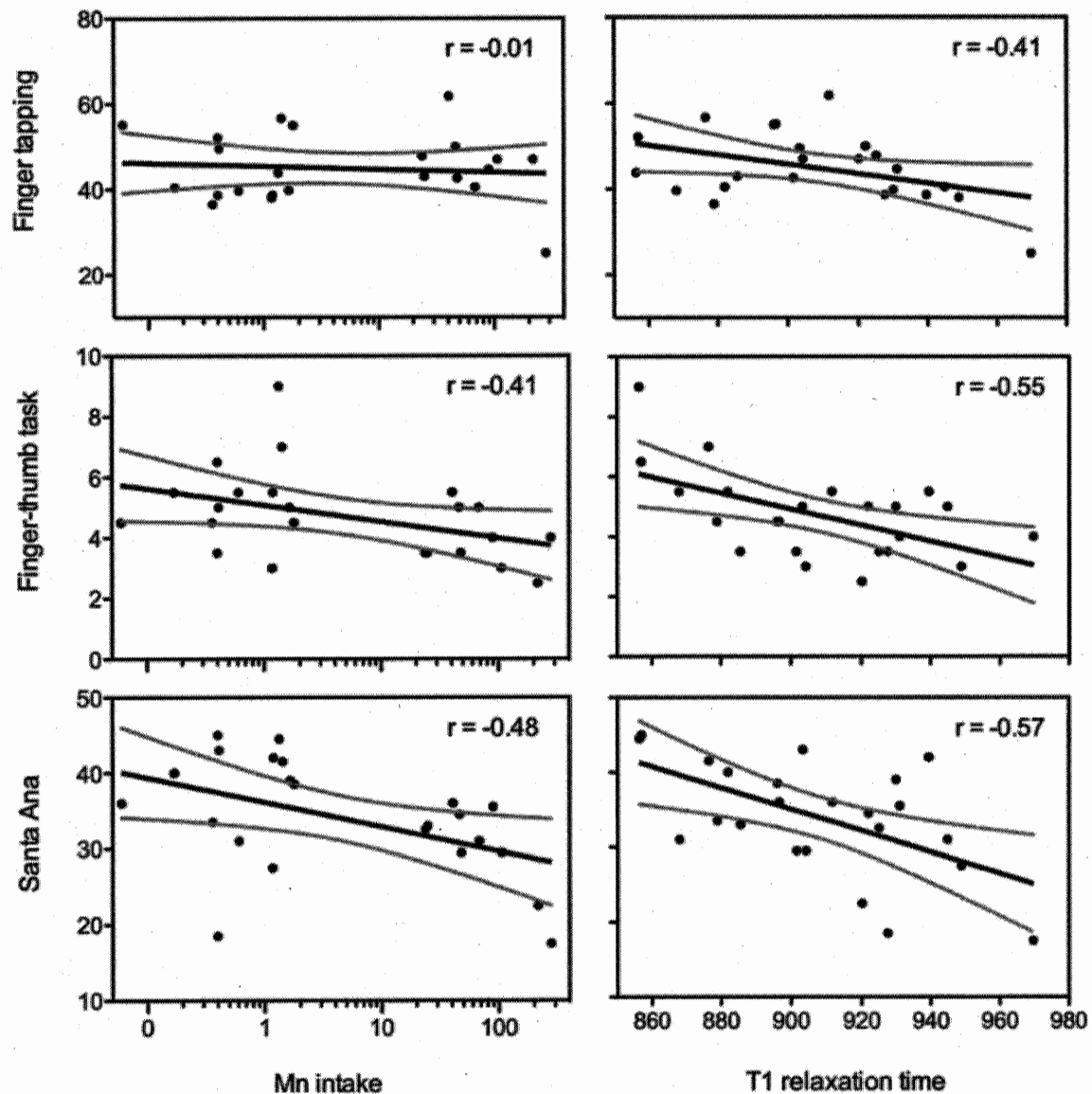


Figure 3.4 Scatterplot of Mn intake (left) and T1 relaxation time (right) and motor performance. Regression slopes and 95% confidence intervals are also shown.

3.4.4 T2* relaxation time

It is commonly expected that T1 hypointensity result in T2 hyperintensity and vice-versa (e.g., Kim et al., 2014; Long et al., 2014; Zimny et al., 2013). We verified whether the aforementioned findings related to the T1 relaxation time were present in

the T2* relaxation time imaging. No difference of T2* signal intensity was found between low- and high-exposure groups (mean ranks = 10.1 and 13.6, respectively; $U = 40$, $p = 0.24$). Furthermore, all the correlation tests between T2* and Mn exposure as well as motor function were not significant ($p > 0.10$). Although the T1 relaxation time and T2* were positively correlated, as expected (e.g., Long et al., 2014), this correlation was not significant ($r = 0.36$, $p = 0.1$).

3.5. Discussion

The present study is the first to investigate MRI signal intensity in a group of children exposed to Mn at relatively low levels in drinking water. These Mn concentrations are commonly encountered in water. In the U.S., 11% of private wells and 8% of public wells have Mn concentrations above 145 ug/L (U.S. Geological Survey, 2005), which corresponds with the median Mn concentration in our high-exposure group. We observed evidence of T1 signal intensity differences in the GP between children in relation to Mn in water. The signal intensity for the PI calculated with pericranial muscles as reference was significantly lower in children from the high-exposure group compared with the low-exposure group. Consistent with this finding, a longer T1 relaxation time was observed in children in the higher water Mn concentration group. The analysis using Mn estimated intake (taking into account the amount of water consumed and the weight of the child) also yielded similar significant associations indicating hypointensity with greater exposure. Interestingly, both Mn intake exposure and T1 relaxation time were correlated with poorer fine motor performance. No group difference or correlation was found for the PI calculated with the frontal white matter as reference, which is the usual PI metric.

Our results contrast with several previous studies on Mn neurotoxicity in occupationally-exposed individuals, reporting MRI hyperintensity in the GP, which is suggestive of local Mn accumulation. Of note, these studies were carried out on adult workers exposed to airborne Mn (e.g. Long et al., 2014; Sen et al., 2011). The fact that waterborne Mn involves different pathways and homeostatic regulation than inhaled Mn may explain why Mn deposits in the GP were not observed. Indeed, inhaled Mn bypasses the control processes in the gastrointestinal tract and becomes more efficient for brain Mn delivery (Andersen et al., 1999).

It is well known that in highly exposed adult workers Mn rapidly clears from the brain after cessation of exposure and signal intensity in the GP normalizes (e.g., Nelson et al., 1993). However, some cognitive and psychiatric symptoms may persist long after the end of exposure in men with past occupational exposure (Bouchard et al., 2007b), which can suggest irreversible neurological damage. It has been shown that Mn induces microstructural damage to the white matter in the corpus callosum and frontal regions, and decreases the volume of the GP in Mn-exposed welders (Chang et al., 2013; Kim et al., 2011). However, those studies investigated adult workers who showed higher T1 signal intensity in the GP compared to controls. On the other hand, severe brain anomalies such as those following carbon monoxide poisoning (Lo et al., 2007; O'Donnell et al., 2000) have been associated with visible hypointensity on the GP T1-weighted images. In the present study, the GP hypointensity in the Mn high-exposed individuals was much more subtle (i.e., undetectable to the eye), but was nevertheless related to poorer fine motor functions, supporting its functional significance. This finding is in agreement with the fact that the basal ganglia are well known to play a major role in motor control (Brown et al., 1997).

A growing body of evidence shows that basal ganglia also contribute to executive functions, error detection, and reward and motivation functions (Brown et al., 1997; Smith et al., 2009; Van Schouwenburg et al., 2013). Although damages to the basal

ganglia can account for, at least in part, some of the deficits shown in studies on Mn neurotoxicity, the association of Mn exposure with lower cognitive functioning and behavioral problems (Bouchard et al., 2007a; Bouchard et al., 2011; Khan et al., 2011; Oulhote et al., 2014) suggests that other brain structures might be involved. Evidence from an MRI study have highlighted the involvement of the olfactory bulb, frontal lobes and the putamen, as well as other areas of Mn deposition in adult asymptomatic welders (Sen et al., 2011). As such, diffuse structural and/or functional abnormalities in the brain are likely better to explain the observed deficits in children exposed to Mn from drinking water, but further studies are needed to test this hypothesis.

The limitations of our study include potential selection bias, and exposure error measurement due to the fact that the amount of water ingested was estimated based on child and parental report, and Mn concentration was measured in home drinking water but not at school or other locations. In addition, the small sample size, which is often the case in MRI studies due to high costs and the burden to participants, precluded adjustment for potential confounders. One such confounder is the potential impact of metabolic disorders on the MRI pallidal signal (Finelli et al., 2003), although no participant reported health problems. Another potential confounder is iron exposure. Indeed, this metal is also paramagnetic and can therefore affect T1 signal intensity (Zhan et al., 2009). In fact, it is well known that iron and Mn concentrations correlate in groundwater, which was the source for municipal aqueduct and individual well-supplied drinking water in the present study (Barbeau et al., 2011). Of note, in the larger study from which children in the present report were selected, Bouchard et al. (2011), reported that the association between Mn concentration in water and poorer intellectual performance was not attenuated after adjusting for iron concentration in water. Furthermore, we analyzed T2* imaging, which is more optimal to detect iron accumulation. Indeed, iron deposits in the brain

create local magnetic field inhomogeneities that maximally shorten T2 relaxation time (Valdés Hernandez et al., 2012). The absence of results in T2* relaxation time in the present study could thus reflect the absence of iron deposits as well, although we cannot totally exclude this possibility. Interestingly, studies in patients with hepatic insufficiency have shown alteration (hyperintensity) of signal in the T1-weighted MR imaging, while the T2-weighted images were normal (Ochi et al., 2011; Weissenborn et al., 1995; Zeneroli et al., 1991). Such a T1-specific hyperintensity, which is thought to be associated with manganese deposits (Choi et al., 2005; Maffeo et al., 2014), is even stronger in patients with iron deficiency (e.g., Malecki et al., 1999).

3.6 Conclusion

Mn exposure through drinking water in children was associated with lower signal intensity in the GP, which correlated with poorer motor performance. The hypointensity found here contrasts with the previous literature reporting hyperintensity of the GP in exposed individuals, indicative of Mn accumulation. Differences related to pathways and levels of exposure may account for our findings.

3.7 Acknowledgments

We would like to thank Laurent Létourneau-Guillon for his valuable comments on the interpretation of the imaging data. We wish to acknowledge the participants and their families who gave their time and traveled to Montreal to help us carry out the study. We would also like to thank Marie-Eve Brodeur for recruiting participants; her help was greatly appreciated. We are grateful for *Réseau en Bio-imagerie du Québec* (RBIQ) and the *Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ)* for funding this

study. The Canadian Institutes of Health Research (CIHR) funded the original epidemiological study (NRF-82899).

3.8 References

- Andersen, M.E., Gearhart, J.M., Clewell, H.J. (1999). Pharmacokinetic data needs to support risk assessments for inhaled and ingested manganese. *Neurotoxicology*, 20,161-171.
- Barbeau, B., Carrière, A., Bouchard, M.F. (2011). Spatial and temporal variations of manganese concentrations in drinking water. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng*, 46, 608-616.
- Bouchard, M.F., Laforest, F., Vandelac, L., Bellinger, D., Mergler, D. (2007a). Hair manganese and hyperactive behaviors: Pilot study of school-age children exposed through tap water. *Environ Health Perspect*, 115,122-7.
- Bouchard, M.F., Mergler, D., Baldwin, M., Panisset, M., Bowler, R., Roels, H.A. (2007b). Neurobehavioral functioning after cessation of manganese exposure: A follow-up after 14 years. *Am J Ind Med*, 50, 831-840.
- Bouchard, M.F., Sauve, S., Barbeau, B., Legrand, M., Brodeur, M., Bouffard, T., et al. (2011). Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. *Environ Health Perspect*, 119,138-143.
- Bradley, R., Convyn, R., Burchinal, M., McAdoo, H., Coll, C. (2001). The home environments of children in the united states. Part ii: Relations with behavioral development through age thirteen. *Child Dev.*, 72,1868-1886.
- Brna, P., Gordon, K., Dooley, J.M., Price, V. (2011). Manganese toxicity in a child with iron deficiency and polycythemia. *J Child Neurol*, 26, 891-4.
- Brown, L., Schneider, J., Lidsky, T. (1997). Sensory and cognitive functions of the basal ganglia. *Cognitive Neuroscience*, 7,157-163.
- Carvalho, C.F., Menezes-Filho, J.A., de Matos, V.P., Bessa, J.R., Coelho-Santos, J., Viana, G.F., et al. (2014). Elevated airborne manganese and low executive function in school-aged children in Brazil. *Neurotoxicology*, 45, 301-8.
- Chang, Y., Jin, S.U., Kim, Y., Shin, K.M., Lee, H.J., Kim, S.H., et al. (2013). Decreased brain volumes in manganese-exposed welders. *NeuroToxicology*, 37, 182-9.
- Choi, D.S., Kim, E.A., Cheong, H.K., Khang, H.S., Ryoo, J.W., Cho, J.M., et al. (2007). Evaluation of mr signal index for the assessment of occupational

manganese exposure of welders by measurement of local proton t1 relaxation time. *NeuroToxicology*, 28, 284-9.

Choi, Y., Park, J.K., Park, N.H., Shin, J.W., Yoo, C.I., Lee, C.R., et al. (2005). Whole blood and red blood cell manganese reflected signal intensities of T1-weighted magnetic resonance images better than plasma manganese in liver cirrhotics. *J Occup Health*, 47, 68-73.

Dorman, D.C., Struve, M.F., Marshall, M.W., Parkinson, C.U., James, R.A., Wong, B.A. (2006a). Tissue manganese concentrations in young male rhesus monkeys following subchronic manganese sulfate inhalation. *Toxicol Sci*, 92, 201-210.

Dorman, D.C., Struve, M.F., Wong, B.A., Dye, J.A., Robertson, I.D. (2006b). Correlation of brain magnetic resonance imaging changes with pallidal manganese concentrations in rhesus monkeys following subchronic manganese inhalation. *Toxicol Sci*, 92, 219-227.

Dydak, U., Jiang, Y.M., Long, L.L., Zhu, H., Li, W.M., Edden, R.A., et al. (2011). *In Vivo* measurements of brain GABA concentrations by Magnetic Resonance Spectroscopy in smelters occupationally exposed to manganese. *Environmental Health Perspectives*, 119, 219-224.

Finelli, P.F., DiMario, F.J. (2003). Diagnostic approach in patients with symmetric imaging lesions of the deep gray nuclei. *Neurologist*, 9, 250-61.

Fitsanakis, V.A., Zhang, N., Avison, M.J., Gore, J.C., Aschner, J.L., Aschner, M. (2006). The use of magnetic resonance imaging (mri) in the study of manganese neurotoxicity. *NeuroToxicology*, 27, 798-806.

Guilarte, T.R., McGlothlan, J.L., Degaonkar, M., Chen, M.K., Barker, P.B., Syversen, T., et al. (2006). Evidence for cortical dysfunction and widespread manganese accumulation in the nonhuman primate brain following chronic manganese exposure: A 1h-mrs and mri study. *Toxicological Sciences*, 94, 351-8.

Hernandez-Bonilla, D., Schilman, A., Montes, S., Rodriguez-Agudelo, Y., Rodriguez-Dozal, S., Solis-Vivanco, R., et al. (2011). Environmental exposure to manganese and motor function of children in Mexico. *Neurotoxicology*, 32, 615-621.

Huang, C.C., Chu, N.S., Lu, C.S., Chen, R.S., Calne, D.B. (1998). Long-term progression in chronic manganism: ten years of follow-up. *Neurology*, 50, 698-700.

- Khan, K., Factor-Litvak, P., Wasserman, G.A., Liu, X., Ahmed, E., Parvez, F., et al. (2011). Manganese exposure from drinking water and children's classroom behavior in bangladesh. *Environ Health Perspect*, 119, 1501-6.
- Khan, K., Wasserman, G.A., Liu, X., Ahmed, E., Parvez, F., Slavkovich, V., et al. (2012). Manganese exposure from drinking water and children's academic achievement. *NeuroToxicology*, 33, 91-7.
- Kim, S.H., Huh, S.Y., Hyun, J.W., Jeong, I.H., Lee, S.H., Joung, A., et al. (2014). A longitudinal brain magnetic resonance imaging study of neuromyelitis optica spectrum disorder. *PLoS One*, 9, 1-9.
- Kim, Y., Kim, K.S., Yan, J.S., Park, I.J., Kim, E., Yin, Y., et al. (1999). Increase in signal intensities on T1-weighted magnetic resonance images in asymptomatic manganese-exposed welders. *Neurotoxicology*, 20, 901-7.
- Kim, Y., Jeong, K.S., Song, H.J., Lee, J.J., Seo, J.H., Kim, G.C., et al. (2011). Altered white matter microstructural integrity revealed by voxel-wise analysis of diffusion tensor imaging in welders with manganese exposure. *NeuroToxicology*, 32, 100-9.
- Krieger, D., Krieger, S., Jansen, O., Gass, P., Theilmann, L., Lichtnecker, H. (1995). Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *The Lancet*, 346, 270-4.
- Krishna, S., Dodd, C.A., Hekmatyar, S.K., Filipov, N.M. (2014). Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water. *Arch Toxicol.*, 88, 47-64.
- Lee, E.Y., Flynn, M.R., Du, G., Lewis, M.M., Fry, R., Herring, A.H., et al. (2015). T_1 relaxation rate (R1) indicates nonlinear Mn accumulation in brain tissue of welders with low-level exposure. *Toxicol Sci*, 146, 281-9.
- Lo, C.P., Chen, S.Y., Lee, K.W., Chen, W.L., Chen, C.Y., Hsueh, C.J., et al. (2007). Brain injury after acute carbon monoxide poisoning: Early and late complications. *Neuroradiology*, 189, 205-211.
- Long, Z., Jiang, Y.M., Li, X.R., Fadel, W., Xu, J., Yeh, C.L., et al. (2014). Vulnerability of welders to manganese exposure - a neuroimaging study. *Neurotoxicology*, 45, 285-92.
- Lucchini, R., Guazzetti, S., Zoni, S., Donna, F., Peter, S., Zacco, A., et al. (2012). Tremor, olfactory and motor changes in Italian adolescents exposed to historical ferro-manganese emission. *Neurotoxicology*, 33, 687-696.

- Maffeo, E., Montuschi, A., Stura, G., Giordana, M.T. (2014). Chronic acquired hepatocerebral degeneration, pallidal t1 mri hyperintensity and manganese in a series of cirrhotic patients. *Neurol Sci*, 35, 523-530.
- Malecki, E.A., Devenyi, A.G., Barron, T.F., Mosher, T.J., Eslinger, P., Flaherty-Craig, C.V., et al. (1999). Iron and manganese homeostasis in chronic liver disease: relationship to pallidal T1-weighted magnetic resonance signal hyperintensity. *Neurotoxicology*, 20, 647-52.
- Mendonça-Dias, M.H., Gaggelli, E., Lauterbur, P.C. (1983). Paramagnetic contrast agents in nuclear magnetic resonance medical imaging. *Seminars in Nuclear Medicine*, 13, 364-376.
- Menezes-Filho, J.A., Carvalho-Vivas, C.F., Viana, G.F., Ferreira, J.R., Nunes, L.S., Mergler, D., et al. (2014). Elevated manganese exposure and school-aged children's behavior: a gender-stratified analysis. *Neurotoxicology*, 45, 293-300.
- Nelson, K., Golnick, J., Korn, T., Angle, C. (1993). Manganese encephalopathy: Utility of early magnetic resonance imaging. *Br J Ind Med*, 50, 510-3.
- Ochi, T., Taoka, T., Akashi, T., Sakamoto, M., Miyasaka, T., Wada, T. (2011). Discrepancy in T1 and T2 shortening of the globus pallidus in hepatic insufficiency: evaluation by susceptibility-weighted imaging. *Magn Reson Med Sci*, 10, 79-83.
- O'Donnell, P., Buxton, P.J., Pitkin, A., Jarvis, L.J. (2000). The magnetic resonance imaging appearances of the brain in acute carbon monoxide poisoning. *Clin Radiol*, 55, 273-80.
- Oulhote, Y., Mergler, D., Barbeau, B., Bellinger, D., Bouffard, T., Brodeur, M., et al. (2014). Neurobehavioral function in school-age children exposed to manganese in drinking water. *Environ Health Perspect*, 122, 1343-1350.
- Park, J.D., Chung, Y.H., Kim, C.Y., Ha, C.S., Yang, S.O., Khang, H.S. et al. (2007). Comparison of High MRI T1 Signals with Manganese Concentration in Brains of Cynomolgus Monkeys After 8 Months of Stainless Steel Welding-Fume Exposure. *Inhalation Toxicology*, 19, 965-971.
- Riojas-Rodriguez, H., Solis-Vivanco, R., Schilmann, A., Montes, S., Rodriguez, S., Rios, C., et al. (2010). Intellectual function in mexican children living in a mining area and environmentally exposed to manganese. *Environ Health Perspect*, 118, 1465-1470.

- Rodier, J. (1955). Manganese poisoning in Moroccan miners. *Br J Ind Med*, 12, 21-35.
- Sahni, V., Leger, Y., Panaro, L., Allen, M., Giffin, S., Fury, D., et al. (2007). Case report: A metabolic disorder presenting as pediatric manganism. *Environ Health Perspect*, 115, 1776-9.
- Santos, D., Batoreu, C., Mateus, L., Marreilha Dos Santos, A.P., Aschner, M. (2014). Manganese in human parenteral nutrition: Considerations for toxicity and biomonitoring. *Neurotoxicology*, 43, 36-45.
- Sen, S., Flynn, M.R., Du, G., Troster, A.I., An, H., Huang, X. (2011). Manganese accumulation in the olfactory bulbs and other brain regions of "asymptomatic" welders. *Toxicol Sci*, 121, 160-7.
- Smith, S., Tindell, A., Aldridge, J., Berridge, K. (2009). Ventral pallidum roles in reward and motivation. *Behav Brain Res*, 196, 155-167.
- Suzanne, G., Bansal, R., Xu, D., Hao, X., Liu, J., Peterson, B.S. (2011). Neuroanatomical correlates of intellectual ability across the life span. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 1, 305-312.
- Torres-Agustín, R., Rodríguez-Agudelo, Y., Schilman, A., Solís-Vivanco, R., Montes, S., Riojas-Rodríguez, H., et al. (2013). Effect of environmental manganese exposure on verbal learning and memory in mexican children. *Environmental Research*, 121, 39-44.
- U.S. Geological Survey. (2005). National Water-Quality Assessment Program Reston, VA: U.S. Geological Survey; Available from: <http://water.usgs.gov/nawqa/>.
- Valdés Hernandez, Md.C., Maconick, L.C., Tan, E.M., Wardlaw, J.M. (2012). Identification of mineral deposits in the brain on radiological images: a systematic review. *Eur Radiol*, 22, 2371-81.
- Van Schouwenburg, M., Onnink, A., Ter Huurne, N., Kan, C., Zwiers, M., Hoogman, M., et al. (2014). Cognitive flexibility depends on white matter microstructure of the basal ganglia. *Neuropsychologia*, 53, 171-7.
- Wasserman, G.A., Liu, X., Parvez, F., Ahsan, H., Levy, D., Factor-Litvak, P., et al. (2006). Water manganese exposure and children's intellectual function in araihar, bangladesh. *Environ Health Perspect*, 114, 124-9.

- Wasserman, G.A., Liu, X., Parvez, F., Factor-Litvak, P., Ahsan, H., Levy, D., et al. (2011). Arsenic and manganese exposure and children's intellectual function. *Neurotoxicology*, 32, 450-7.
- Weissenborn, K., Ehrenheim, C., Hori, A., Kubicka, S., Manns, M.P. (1995). Pallidal lesions in patients with liver cirrhosis: clinical and MRI evaluation. *Metabolic Brain Disease*, 10, 219-231.
- WHO Office of Occupational Health. (1986). Operational guide for the WHO neurobehavioral test battery (NTCB). World Health Organization (WHO), Geneva.
- Wright, P., Mougin, O., Totman, J., Peters, A., Brookes, M., Coxon, R., et al. (2008). Water proton t1 measurements in brain tissue at 7, 3, and 1.5t using ir-epi, ir-tse, and mprage: Results and optimization. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 21, 121-130.
- Yushkevich, P.A., Piven, J., Hazlett, H.C., Smith, R.G., Ho, S., Gee, J.C., et al. (2006). User-guided 3d active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage*, 31, 1116-1128.
- Zeneroli, M.L., Cioni, G., Crisi, G., Vezzelli, C., Ventura, E. (1991). Globus pallidus alterations and brain atrophy in liver cirrhosis patients with encephalopathy: an MR imaging study. *Magn Reson Imaging*, 9, 295-302.
- Zhan, N., Fitsanakis, V.A., Erikson, K.M., Aschner, M., Avison, M.J., Gore, J.C. (2009). A model for the analysis of competitive relaxation effects of manganese and iron *in vivo*. *NMR in Biomedicine*, 22, 391-404.
- Zimny, A., Zinska, L., Bladowska, J., Neska-Matuszewska, M., Sasiadek, M. (2013). Intracranial lesions with high signal intensity on T1-weighted MR images - review of pathologies. *Pol J Radiol*, 78, 36-46.
- Zoni, S., Albini, E., Lucchini, R. (2007). Neuropsychological testing for the assessment of manganese neurotoxicity: A review and a proposal. *American Journal of Industrial Medicine*, 50, 812-830.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 Discussion

L'objectif général de cette thèse visait à étudier les effets du Mn sur le cerveau d'enfants et d'adolescents exposés au Mn par la consommation d'eau potable. Nous voulions investiguer les possibles altérations cérébrales d'une telle exposition au niveau fonctionnel et anatomique. Cela a été possible grâce à un suivi longitudinal de l'exposition au Mn et des scores de QI d'enfants de la cohorte «Edu-Mango», ainsi qu'à une étude d'imagerie cérébrale chez un sous-groupe d'enfants de cette cohorte. Dans ce chapitre, les résultats des deux articles seront discutés séparément et une discussion générale sera ensuite proposée.

4.1.1 Article 1 : Étude de suivi

Puisque les fonctions cognitives des enfants sont particulièrement vulnérables à l'exposition au Mn par la consommation d'eau potable, est-ce que les atteintes cognitives persistent lorsque ceux-ci atteignent l'adolescence? Observerons-nous des changements sur le QI advenant des changements au niveau de l'exposition au Mn? Voici les questions auxquelles le premier article de cette thèse vise à répondre. Les

résultats ont montré qu'une augmentation des concentrations de Mn dans l'eau (MnW) était associée à l'adolescence à un plus faible QI de performance chez les filles et, inversement, à un plus haut QI de performance chez les garçons. Des associations similaires ont été observées entre les concentrations de Mn dans les cheveux (MnH) et le QI de performance, bien que ces dernières n'étaient pas significatives. La mesure de la concentration moyenne de Mn dans le temps (*time-averaged water Mn exposure*, TAWMn) était associée à un plus faible QI de performance seulement chez les filles et cette diminution du QI était constante à travers les différents niveaux d'exposition. D'ailleurs, les mesures de MnW et TAWMn seraient de bons prédicteurs du QI de performance chez les filles. Enfin, les associations semblent plus importantes entre l'exposition au Mn et le QI de performance comparativement au QI total ou au QI verbal.

La relation entre les changements de concentration de Mn dans l'eau et les changements de scores de QI des participants entre l'évaluation initiale et l'évaluation de suivi a été analysée. Les résultats révèlent que les participants pour qui leur niveau d'exposition a augmenté entre ces deux évaluations ont des scores de QI de performance plus faibles lors de l'évaluation de suivi. Bien que ce résultat soit intéressant et original, il doit être interprété avec prudence puisqu'il n'est pas possible d'exclure la présence d'une erreur de type 1 due aux comparaisons multiples. D'autre part, l'hypothèse initiale voulant qu'une réduction de la concentration de Mn dans l'eau chez les enfants qui avaient été préalablement exposés à de hautes concentrations de Mn puisse améliorer leurs scores de QI n'a pas été confirmée. En effet, cette réduction de l'exposition ne semble pas occasionner de changement au niveau du QI. Remarquons que dans notre cohorte, peu de familles ont finalement augmenté ou diminué de manière importante leur niveau d'exposition. Des analyses visant à examiner l'effet de changements dans l'exposition au Mn sur le fonctionnement intellectuel doivent donc être répliquées dans des études ultérieures afin d'appuyer nos résultats.

Les résultats de cette étude suggèrent que l'effet d'une exposition au Mn par la consommation d'eau potable sur le fonctionnement intellectuel évolue entre l'enfance et l'adolescence. Les concentrations de Mn dans l'eau étaient associées à de plus faibles scores de QI total, verbal et de performance chez les garçons et les filles durant l'enfance (Bouchard et al., 2011). Cette association demeure présente à l'adolescence, mais seulement pour les filles. Notons que l'association entre le Mn dans l'eau et le QI dans l'étude initiale était aussi plus importante chez les filles que chez les garçons. À l'inverse, une association positive entre le MnW et le QI est observée chez les garçons. À notre connaissance, cette étude est la première à avoir suivi une cohorte d'enfants exposés à différentes concentrations de Mn dans l'eau de l'enfance à l'adolescence. Les rares études longitudinales effectuées ont suivi des cohortes d'enfants avant l'âge de 11 ans (Mora et al., 2015; Rahman et al., 2016; Wasserman et al., 2016).

Dans la présente étude, certaines mesures d'exposition au Mn sont associées positivement au QI des garçons. Bien que ces résultats soient surprenants, d'autres études ont rapporté des associations positives entre l'exposition au Mn et certaines fonctions cognitives. Mora et coll. (2015) ont observé que des niveaux d'exposition au Mn plus élevés durant les périodes prénatale et postnatale étaient associés à une meilleure performance cognitive pour les garçons seulement. À l'inverse, Rahman et coll. (2016) a observé une association positive entre la concentration prénatale de Mn dans l'eau et les performances cognitives chez les filles seulement. Néanmoins, les participants de cette dernière étude proviennent d'environnement culturel différent, ce qui peut influencer l'exposition au Mn (p. ex. : différences dans les patrons d'exposition et l'alimentation). Il est donc possible que notre échantillon ne puisse être adéquatement comparé à cette étude. Bien qu'il ne soit pas possible d'exclure la possibilité qu'une variable de confusion affecte l'ampleur et la direction des associations positives observées chez les garçons, elles peuvent néanmoins refléter l'existence de mécanismes différents entre les sexes et la possibilité qu'une

exposition au Mn ait un effet bénéfique sur le développement. Les mécanismes sous-jacents des différences intersexes sont pour l'instant inconnus. Il a toutefois été rapporté que les femmes ont des concentrations de Mn dans le sang plus élevées que les hommes, et ce, à toutes les périodes de la vie (Oulhote et al., 2014). Ces concentrations sont similaires pour les filles entre l'enfance et l'adolescence, mais diminuent chez les garçons entre ces deux périodes du développement. Puisque le Mn est un oligoélément, il serait possible de spéculer que dans notre échantillon, les garçons puissent bénéficier d'une augmentation de l'apport en Mn provenant de l'eau potable à l'adolescence, lorsque leurs concentrations sanguines sont plus basses.

Comme le démontrent les résultats de cette étude, l'effet du sexe est un facteur important à considérer lorsque l'on étudie la neurotoxicité du Mn. Le sexe est souvent contrôlé en ajoutant cette variable aux modèles statistiques comme potentielle variable de confusion (par ex.: Bouchard, Laforest, et al., 2007; Haynes et al., 2015; Khan et al., 2011). Il est maintenant rare de ne pas considérer cette variable, bien que certaines études la négligent toujours (par ex.: Wasserman et al., 2016). Il est même maintenant recommandé d'analyser les données en stratifiant pour le sexe, c'est-à-dire en effectuant des analyses distinctes pour les garçons et les filles (Mergler, 2012; Roels et al., 2012). Cela permet d'apprécier les effets spécifiques du Mn chez les filles et les garçons. Néanmoins, bien que de plus en plus d'études utilisent cette technique de stratification des analyses par le sexe, leurs résultats sont disparates et ne permettent pas de conclure à un profil de neurotoxicité spécifique aux garçons et aux filles. La plupart des études épidémiologiques rapportent des associations négatives plus importantes entre l'exposition au Mn et le fonctionnement intellectuel ou comportemental chez les filles comparativement aux garçons (Bouchard et al., 2011; Menezes-Filho et al., 2014; Riojas-Rodriguez et al., 2010). À l'inverse, une récente étude a montré que l'exposition pré et postnatale au Mn dans l'eau était associée négativement aux fonctions intellectuelles, principalement l'indice de mémoire de travail, chez les garçons (Rahman et al., 2016). Dans la présente

étude, l'exposition au Mn était associée au QI de performance négativement chez les filles et positivement chez les garçons. Les mécanismes sous-jacents de ces différences observées entre les garçons et les filles ne sont pas encore compris. La littérature rapporte des différences entre les sexes par rapport à l'absorption et la distribution du Mn dans l'organisme. Par exemple, selon Finley et coll. (1994), les hommes absorberaient moins de Mn, mais la demi-vie biologique du Mn serait plus longue chez ces derniers comparativement aux femmes. Une étude expérimentale a observé des altérations de la morphologie des neurones dépendante du sexe de la souris suite à une exposition au Mn (Madison et al., 2011). Ces études suggèrent donc que l'effet d'une exposition au Mn et ces mécanismes sous-jacents seraient différents selon le sexe. Davantage d'études sont nécessaires pour appuyer ces suggestions.

Suite à la documentation dans cet article d'associations positives et négatives entre l'exposition au Mn et les fonctions intellectuelles, il est intéressant de réfléchir au rôle contrastant du Mn qui est à la fois essentiel à l'organisme et à la fois neurotoxique. Puisque le Mn est essentiel au métabolisme, une trop faible concentration de Mn dans l'organisme peut être nocive. À l'opposé, une trop forte concentration de Mn dans l'organisme à un potentiel neurotoxique. Dans cet ordre d'idées, quelques études ont présenté une association non linéaire en forme de U entre la concentration de Mn dans le sang de la mère et du nourrisson et le développement mental et psychomoteur de ce dernier (Chung et al., 2015; Claus Henn et al., 2010). Ainsi, les faibles et les fortes concentrations de Mn étaient associées négativement à leur développement. Deux autres études ont relevé ce type d'association non linéaire. Suite à la décharge de plusieurs centaines de milliers de livres de Mn dans l'air à chaque année par une raffinerie française de ferromanganèse en Ohio, Haynes et coll. (2015) ont évalué le QI de 404 enfants âgés entre 7 et 9 ans habitant à proximité de cette raffinerie. Ils ont trouvé que les concentrations faibles et

élevées de Mn dans le sang étaient associées négativement aux scores de QI. Bhang et coll. (2013) ont évalué 1089 enfants âgés de 8 à 11 ans. Les enfants avec une forte concentration de Mn dans le sang avaient des scores plus faibles à différentes épreuves et questionnaires (lecture, score de pensée [*thinking score*], calcul, quotient d'apprentissage et erreurs de commissions dans une épreuve d'attention soutenue). Dans cette même étude, les enfants avec une faible concentration de Mn dans le sang avaient de plus faibles scores à l'épreuve du Stroop (condition lecture des couleurs). Ces études suggèrent donc que de faibles et de fortes concentrations de Mn dans le sang auraient des effets négatifs sur le développement et la cognition. Claus Henn et coll. (2010) proposent que ce type d'association en U puisse être expliqué par l'effet du Mn sur le stress oxydatif lorsque les concentrations de Mn sont faibles et lorsqu'elles sont élevées. En effet, le Mn est un cofacteur pour des enzymes qui protègent contre le stress oxydatif et il serait aussi un antioxydant. Pour cette raison, une faible concentration de Mn dans le sang pourrait augmenter la vulnérabilité des neurones au stress oxydatif. Ceci expliquerait les associations négatives observées lorsque de faibles concentrations de Mn sont mesurées dans le sang. À l'inverse, le Mn devient lui-même un oxydant s'il se retrouve en excès dans le sang. En effet, le Mn peut oxyder la dopamine et altérer les fonctions des mitochondries, ce qui résulte en une augmentation du stress oxydatif. Les rôles contrastants du Mn pourraient expliquer les associations en forme de U des dernières études présentées.

4.1.2 Article 2 : Étude d'imagerie cérébrale

Le second article de cette thèse s'intéresse à l'impact du Mn sur les régions cérébrales habituellement impliquées lors d'une exposition au Mn chez des enfants exposés par la consommation d'eau potable. Ceci a été possible grâce à l'utilisation de diverses techniques permettant de mesurer l'intensité du signal IRM. En effet, à cause de la propriété paramagnétique du Mn, il est possible d'observer sa présence dans certaines

régions cérébrales, dont le GP. Cette étude d'imagerie est la première à s'intéresser à des enfants exposés à des concentrations relativement faibles de Mn dans l'eau potable. Les résultats suggèrent une différence dans l'intensité du signal du GP entre les enfants faiblement et hautement exposés au Mn par leur consommation d'eau potable. Les enfants hautement exposés avaient un index pallidal avec référence dans les muscles péricraniens plus faible que les enfants faiblement exposés. De façon similaire, le temps de relaxation T1 était plus long chez les enfants hautement exposés, reflétant une intensité du signal plus faible. Une augmentation de l'estimation de l'apport en Mn (*Mn intake*) et du temps de relaxation T1 étaient associés à une performance plus faible dans des épreuves évaluant la motricité fine. Ainsi, plus le temps de relaxation T1 était long (ce qui reflète une intensité plus faible) et plus l'apport en Mn était grand, plus la performance à ces épreuves était faible.

Ces résultats diffèrent d'une de nos hypothèses initiales selon laquelle l'intensité du signal IRM dans le GP serait plus élevée chez les enfants davantage exposés au Mn. Cette hypothèse se basait sur des données IRM provenant majoritairement d'adultes exposés par l'inhalation de particules de Mn dans l'air à leur travail. Ces études montraient, à l'inverse de nos résultats, une hyperintensité du signal IRM dans le GP des participants exposés. Cette hyperintensité suggère habituellement la présence de dépôts de Mn dans cette région. Certains facteurs peuvent expliquer en partie la disparité entre nos résultats et ceux de ces études: les populations cibles (enfants versus adultes), les voies d'exposition (ingestion par consommation d'eau potable versus inhalation) et les niveaux d'exposition. Alors, bien que nos résultats contrastent avec la littérature, cette étude permet une nouvelle perspective sur le sujet. Il est possible que le Mn affecte différemment le cerveau d'enfants exposés au Mn par la consommation d'eau potable. Nous savons que le Mn inhalé entre plus directement dans l'organisme puisqu'il ne passe pas par le contrôle homéostatique du tube digestif et nous savons que les enfants sont particulièrement vulnérables aux

effets neurotoxiques des contaminants environnementaux (Andersen et al., 1999; ATSDR Child Health Workgroup, 1997). Ces facteurs peuvent influencer la façon dont le Mn se distribue dans l'organisme et, particulièrement, dans le cerveau.

Questionnons-nous à présent spécifiquement sur la faible intensité du signal IRM observée dans le GP des enfants hautement exposés au Mn. Son interprétation est difficile puisqu'il est généralement question dans la littérature d'hypointensité franche et observable directement sur les images IRM pondérées en T1 ou en T2 (une hypointensité en T1 équivaut à une hyperintensité en T2). Par exemple, lors d'une intoxication au monoxyde de carbone, il est possible d'observer directement une hypointensité dans le GP sur des images pondérées en T1 (Lo et al., 2007). Dans notre étude, l'intensité du signal IRM était plus faible relativement à celle des enfants faiblement exposés et elle n'était pas observable « à l'œil nu » sur les images pondérées en T1. Il est possible de se demander si ces résultats pourraient refléter des différences structurelles dans le GP des enfants hautement exposés comparativement aux enfants faiblement exposés au Mn. Une seconde étude d'imagerie (voir Annexe A: Lao et al., 2017) a été effectuée chez notre sous-groupe d'enfants et visait à investiguer les différences morphologiques des noyaux gris centraux (GP, noyau caudé et putamen) à l'aide d'une technique appelée morphométrie basée sur des tenseurs (*tensor based morphometry*). Les résultats suggèrent que le putamen et la GP gauche seraient plus larges chez les enfants hautement exposés comparativement à ceux des enfants faiblement exposés. Ces régions ont ensuite été corrélées avec la performance à des tâches motrices. L'élargissement des régions spécifiées plus haut était corrélé à une performance motrice plus faible. Ces résultats concordent avec une étude suggérant qu'une région antérieure des noyaux gris centraux (principalement du putamen) plus large serait associée à des scores plus faibles à des épreuves cognitives (Sandman et al., 2014). L'implication d'autres régions des noyaux gris centraux, tels le noyau caudé et le putamen, n'est pas surprenante. Certains auteurs avaient observé que l'exposition au Mn était corrélée avec l'intensité du signal IRM

du GP, mais aussi avec celle du noyau caudé et du putamen (Criswell et al., 2012; Lewis et al., 2016). De plus, une étude d'imagerie par diffusion a observé des changements microstructuraux dans le GP associés à une exposition chronique à de faibles concentrations de Mn chez des travailleurs (Lee et al., 2016). Bref, les résultats du second article de cette thèse pourraient être une conséquence de différences structurelles entre les enfants hautement et faiblement exposés. Davantage d'études sur le sujet sont nécessaires pour éclaircir ces résultats.

Une autre considération est l'aspect de temporalité des biomarqueurs utilisés pour évaluer l'exposition de nos participants. Ainsi, l'investigation de l'intensité du signal IRM permet d'évaluer l'exposition au Mn survenue à plus ou moins court terme. Selon Kim et coll. (1999), l'augmentation du signal dans le GP refléterait une exposition récente au Mn. Dans ce sens, si les enfants de notre étude sont exposés à de faibles concentrations, mais sur de longues périodes de temps, il se peut que la présence de Mn dans le cerveau ne puisse pas être observable à l'aide de l'intensité du signal IRM dans le GP. Il est donc possible que ce biomarqueur soit moins adéquat pour l'évaluation d'une exposition à long terme à faibles concentrations. La voie d'exposition pourrait aussi rendre ce biomarqueur moins adéquat puisque le Mn ingéré passe par le contrôle du tube digestif et se distribue moins efficacement au cerveau, contrairement au Mn inhalé (Aschner et al., 2005). Néanmoins, il faut se demander si le passage à long terme du Mn dans le cerveau pourrait causer des altérations cérébrales malgré l'absence d'hyperintensité dans le GP. De plus, seules deux études de cas ont montré une hyperintensité chez des enfants exposés au Mn présent dans l'eau potable (Brna, Gordon, Dooley, & Price, 2011; Sahni et al., 2007). Ces enfants étaient toutefois exposés à de fortes concentrations et les résultats de ces études étaient possiblement causés par des troubles métaboliques (p. ex. : une carence en fer) combinés à l'exposition au Mn. Il faut donc davantage d'études pour savoir si ce biomarqueur d'IRM est réellement adéquat dans le contexte d'une exposition au Mn par la consommation d'eau potable.

Le sexe est un autre facteur qui pourrait être déterminant pour l'interprétation des résultats de l'article. L'échantillon d'enfants de la présente étude était trop petit pour pouvoir faire des analyses stratifiées par le sexe. Nous avons néanmoins effectué des analyses de sensibilité en ajoutant aux modèles univariés l'âge et le sexe et les résultats demeuraient similaires. En effet, les associations entre l'exposition au Mn et l'index pallidal avec muscles péricraniens et avec le temps de relaxation T1 demeuraient significatives. À notre connaissance, aucune étude en imagerie cérébrale s'intéressant aux différences structurelles ou fonctionnelles associées à une exposition au Mn n'a investigué l'effet du sexe sur ces différences.

Dans l'étude, des résultats différents ont été observés pour les index pallidaux avec référence dans la matière blanche et dans les muscles péricraniens. En effet, l'index pallidal avec référence dans les muscles péricraniens était plus faible chez nos sujets hautement exposés comparativement aux faiblement exposés. Il n'y avait aucune différence significative entre les groupes d'exposition pour l'index pallidal avec référence dans la matière blanche. Ce dernier est l'index habituellement utilisé dans les études sur la neurotoxicité du Mn, tandis que l'index avec référence dans les muscles péricraniens n'a été mesuré qu'une fois chez des macaques (Guilarte et al., 2006). Nous sommes donc la première étude à avoir utilisé cet index chez l'humain. L'avantage de l'utilisation de cette référence est qu'elle est située à l'extérieur du cortex. Puisque le Mn se dépose dans la matière blanche frontale, ainsi que d'autres régions cérébrales, l'utilisation d'une référence hors cortex est tout à fait légitime (Sen et al., 2011). De plus, nous cherchions un index pallidal qui reflète adéquatement l'intensité du signal dans le GP. Or, seul l'index pallidal avec référence dans les muscles péricraniens corrélait avec le temps de relaxation T1, qui reflète l'intensité du signal IRM. Ainsi, s'il n'est pas possible d'utiliser le temps de relaxation T1, l'index pallidal avec une référence à l'extérieur du cortex serait une alternative appropriée à l'index pallidal avec référence dans la matière blanche frontale.

4.1.3 Limites des deux études

Il existe plusieurs limites aux études transversales et longitudinales s'intéressant à l'exposition au Mn. D'abord, les études se basent souvent sur des biomarqueurs mesurés à un seul moment pour évaluer le niveau d'exposition au Mn. Les études estiment ensuite que les participants ont été exposés chroniquement à ce niveau, ce qui n'est pas toujours le cas. Ceci est particulièrement vrai pour les échantillons de sang et d'urine qui mesurent l'exposition récente au Mn (Zheng et al., 2011). Ils permettent donc de connaître le niveau d'exposition la journée où le participant a été évalué et ne reflète pas nécessairement l'exposition antérieure. Par contre, la concentration de Mn mesurée dans les cheveux – telle qu'utilisée dans nos travaux – refléterait une exposition sur une plus longue période de temps et serait donc plus appropriée lors d'exposition à long terme (Coetzee et al., 2016). Ils permettraient de refléter la concentration circulante de Mn dans l'organisme lorsque les follicules se forment. Nos cheveux poussent environ 1 cm par mois. Donc les échantillons de cheveux permettraient d'estimer l'exposition sur une durée dépendante de la longueur des échantillons utilisés. Dans notre étude, nous avons utilisé les deux premiers centimètres de cheveux (près du scalpe). Nos échantillons refléteraient donc l'exposition au Mn sur plusieurs semaines. Par contre, ce biomarqueur peut être sujet à des contaminations exogènes de particules. Par ailleurs, il apparaît probable qu'un individu soit affecté différemment en fonction de la durée d'exposition au Mn. Dans le premier article de cette thèse, nous avons essayé de pallier à ce problème en calculant une moyenne des concentrations de Mn dans l'eau mesurées lors de l'évaluation initiale et de l'évaluation de suivi. Ceci nous a permis de calculer une concentration moyenne de Mn dans le temps (*time-averaged water Mn exposure*) en considérant les changements ayant modifié significativement la concentration de Mn dans l'eau du robinet. Cette mesure nous permet d'avoir une estimation de l'exposition moyenne au Mn de nos participants durant les années séparant l'étude initiale de l'étude de suivi.

D'autre part, un désavantage d'utiliser les concentrations de Mn dans l'eau est qu'elles ne reflètent possiblement pas la concentration de Mn dans l'organisme. Elles ne considèrent pas non plus les habitudes de consommation des participants (p. ex. : si celui-ci boit seulement de l'eau embouteillée). Dans l'article de Bouchard et coll. (2011) et dans le second article de cette thèse, une estimation de l'apport en Mn (*Mn intake*) a été utilisée comme mesure d'exposition au Mn (voir Annexe B). Cette mesure tient compte des données recueillies à l'aide de questionnaires sur les habitudes de consommation d'eau des participants. Cette mesure n'a pas été utilisée systématiquement puisqu'elle peut comporter des erreurs de mesure causées par le caractère subjectif des questionnaires. Dans l'article de Bouchard et coll. (2011), la concentration de Mn dans l'eau potable était un meilleur prédicteur du QI des enfants que l'estimation de l'apport en Mn. Bref, la concentration de Mn dans l'eau et l'estimation de l'apport en Mn comporte des avantages et des désavantages, mais il semble que mesurer la concentration de Mn dans l'eau soit plus appropriée.

L'hétérogénéité des études est une limite commune à toutes les études sur la neurotoxicité du Mn. En effet, la comparaison des différentes études transversales sur le sujet est restreinte par leur hétérogénéité. L'utilisation de différents biomarqueurs et outils d'évaluation, la présence de différents niveaux d'exposition, l'évaluation de différentes populations et fonctions cérébrales (cognitives, psychiatriques et comportementales) limitent la possibilité de distinguer un profil d'exposition type reflétant les effets spécifiques du Mn.

De plus, il existe des périodes critiques pour le développement du cerveau qui ont une incidence sur le développement cognitif, psychiatrique et comportemental ultérieur des enfants. La grossesse est une période où le fœtus est particulièrement vulnérable à l'exposition aux contaminants. Certaines études ont observé l'impact de la présence de différentes concentrations de Mn sur le développement du cerveau lors de ces périodes critiques à l'aide de données prénatales (par ex.: Mora et al.,

2015; Rahman et al., 2016). Les biomarqueurs prénataux souvent utilisés sont le sang de cordon, le sang de la mère avant l'accouchement et les dents de lait (c.-à-d. qui se détachent d'elles-mêmes). Recueillir les dents caduques permet de récolter des informations sur l'exposition au Mn durant le second trimestre de grossesse (13 à 16 semaines après la gestation) jusqu'à 10 à 11 mois après la naissance (Arora et al., 2012). L'exposition à des niveaux élevés de Mn mesurés à l'aide de données prénatales a été associée principalement à des problèmes comportementaux entre 5 et 11 ans (Ericson et al., 2007; Mora et al., 2015; Rahman et al., 2016) et à de plus faibles indices de développement psychomoteur entre l'âge de 6 mois et 3 ans (Chung et al., 2015; Gunier et al., 2015; Takser, Mergler, Hellier, Sahuquillo, & Huel, 2003). Il aurait été intéressant de recueillir ce type de données afin d'évaluer si les effets observés dans les deux études de cette thèse provenaient en partie de l'exposition prénatale au Mn.

Une autre limite des études présentées dans cette thèse est qu'elles ne permettent pas d'examiner de liens de causalité entre l'exposition et l'effet. Nous pouvons observer les associations entre les différentes mesures d'exposition et les mesures des fonctions cérébrales, mais des liens causaux ne peuvent en être tirés. Cette limite est partagée par la grande majorité des études épidémiologiques, en particulier transversales. Nous pouvons émettre une hypothèse de relation causale lorsque l'on retrouve une relation dose-réponse, comme rapportée dans l'étude initiale de Bouchard et coll. (2011) entre la concentration de Mn dans l'eau et les scores de QI. Il faut néanmoins être prudent avec ce type de conclusion. Pour l'instant, un nombre d'études important sur ce sujet supporte l'hypothèse que le Mn est neurotoxique pour le développement des enfants. Une augmentation du nombre d'études rapportant des relations dose-réponse et reproduisant les résultats des études sur la neurotoxicité du Mn chez les enfants sera néanmoins nécessaire afin de renforcer ces observations. Les deux études de cette thèse appuient aussi cette hypothèse et apportent une

perspective nouvelle sur le sujet en suivant les participants de l'enfance à l'adolescence et en effectuant des analyses d'imagerie cérébrale.

4.1.4 Perspectives futures

En dépit des limites soulevées, les deux études présentées dans le cadre de cette thèse apportent de nouvelles données sur l'effet d'une exposition au Mn provenant de l'eau potable chez les enfants. Ces deux études sont uniques et offrent chacune une perspective originale sur le sujet, soit une perspective longitudinale de l'enfance à l'adolescence sur l'effet d'une telle exposition sur le QI et l'utilisation de l'imagerie cérébrale chez cette population.

Les études futures s'intéressant à l'exposition du Mn provenant de l'eau potable apporteront des éclaircissements aux questions soulevées dans cette thèse. Il serait important d'explorer davantage certaines perspectives. D'une part, l'inclusion systématique d'analyses statistiques stratifiées pour le sexe serait recommandée pour les études animales, épidémiologiques et aussi pour les études en imagerie cérébrale. D'autre part, l'étude de larges cohortes suivies de la période prénatale à l'enfance offre plusieurs avantages, bien qu'elles soient dispendieuses. Ce type d'étude permet de documenter les expositions durant différentes périodes de développement et peut offrir de mesurer les concentrations dans l'environnement et dans l'organisme durant ces différentes périodes. Enfin, les modèles pharmacocinétiques basés sur la physiologie (PBPK) sont prometteurs pour modéliser l'exposition au Mn en tenant compte de divers facteurs influençant le Mn dans l'organisme. Ces modèles permettraient un reflet plus adéquat de l'exposition réelle des participants.

4.1.5 Discussion générale

Bien que de nouvelles normes aient été développées par Santé Canada en 2016, l'OMS a discontinué ses lignes directrices situant la limite acceptable pour la concentration de Mn dans l'eau à 400 µg/L. Cette organisation indiquait que cette norme était bien au-dessus de ce qui est habituellement mesuré dans l'eau potable (Frisbie et al., 2012; Organisation Mondiale de la Santé, 2011). Pourtant, 4% de l'échantillon d'enfants évalués lors de l'étude initiale associée à la présente thèse dépassait cette limite et 1 % lors de l'étude de suivi. Cette diminution est principalement due à la campagne de sensibilisation auprès des participants suite à l'étude initiale de Bouchard et coll. (2011). Frisbie et coll. (2012) ont aussi spécifié qu'il était possible de retrouver des concentrations de Mn dans l'eau outrepassant 400 µg/L dans de nombreux pays, dont le Canada, les États-Unis, la Grèce, le Japon et le Bangladesh. Au Canada, nous possédons désormais une recommandation pour la concentration maximale acceptable de Mn dans l'eau à 100 µg/L et un objectif esthétique de 20 µg/L (Santé Canada, 2016). Le ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques a effectué des campagnes d'échantillonnage au Québec puisqu'avant 2016, il n'y avait pas de normes officielles sur la concentration sécuritaire de Mn dans l'eau potable. Ils ont observé que, des 410 échantillons prélevés, 7.6% avaient un niveau supérieur à 100 µg/L et 12.7% étaient supérieurs à l'objectif esthétique de 20 µg/L (Ministère du Développement durable de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2014). Ainsi, de nombreux foyers, principalement dans les milieux ruraux, devront faire analyser la qualité de leur eau potable afin de s'assurer qu'ils respectent ces normes.

Enfin, il faut comprendre l'importance des résultats de cette thèse en terme sociétal. Au niveau de l'individu, il est possible que l'effet du Mn tel que décrit dans les articles de cette thèse ne se reflète pas en un déficit observable au quotidien.

Toutefois, au niveau sociétal, une diminution du QI de quelques points, par exemple, peut avoir un impact important dans les salles de classe et dans les milieux familiaux.

4.2 Conclusion

En somme, deux études ont été proposées afin d'approfondir nos connaissances sur la neurotoxicité du Mn chez les enfants exposés par la consommation d'eau potable. La première étude visait à suivre une cohorte d'enfants afin d'observer l'association entre l'exposition au Mn et le QI à l'adolescence, ainsi que d'examiner si des changements de niveaux d'exposition entre les concentrations de Mn mesurées lors de l'évaluation initiale et lors du suivi seraient associés à des changements au niveau du QI. La seconde étude d'imagerie visait à recruter un sous-échantillon de cette cohorte afin d'évaluer l'effet du Mn sur les structures cérébrales habituellement impliquées lors d'une telle exposition.

La première étude de suivi de la cohorte «Édu-Mango» suggère qu'à l'adolescence, les filles demeurent vulnérables aux effets d'une exposition au Mn trouvé dans l'eau potable. En effet, une association entre les mesures de Mn dans l'eau et un plus faible QI de performance a été notée. À l'inverse, cette association était positive chez les garçons. De plus, il semble que pour les participants dont la concentration de Mn dans l'eau potable a augmenté, une diminution des scores de QI de performance a été observée lors de l'évaluation de suivi. Cette étude soutient l'importance de tenir compte du sexe lorsque l'on évalue l'impact du Mn sur les fonctions cérébrales.

Dans la seconde étude, l'exposition au Mn trouvé dans l'eau potable était associée à une plus faible intensité du signal chez les enfants davantage exposés. Cette faible intensité était aussi associée à une plus faible performance à des tâches de motricité. Ces résultats contrastent avec ce qui est relevé dans la littérature, c'est-à-dire qu'une

exposition au Mn chez l'adulte est habituellement associée à une hyperintensité du signal IRM dans le GP, ce qui suggère la présence de dépôts de Mn dans cette région. Ces résultats contrastants pourraient être expliqués par différents facteurs: les sources d'exposition (ingestion versus inhalation), les populations (enfants versus adulte) et le niveau d'exposition.

ANNEXE A

Article : Lao, Y., Dion, L.A., Gilbert, G., Bouchard, M.F., Rocha, G., Wang, Y., Leporé, N., & Saint-Amour, D. (2017) Mapping the basal ganglia alterations in children chronically exposed to manganese. *Sc Reports*, 7.

Mapping the basal ganglia alterations in children chronically exposed to manganese

Yi Lao^{1,2}, Laurie-Anne Dion³, Guillaume Gilbert^{4,6}, Maryse F. Bouchard⁵, Gabriel Rocha², Yalin Wang⁷, Natasha Lepore^{1,2,+}, & Dave Saint-Amour^{3,+}

¹CIBORG laboratory, Department of Radiology, Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles CA, USA

² Department of Biomedical Engineering, University of Southern California, Los Angeles CA, USA

³Department of Psychology, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada

⁴Department of radiology, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

⁵Sainte-Justine Hospital Research Centre and Department of Occupational and Environmental Health, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

⁶MR Clinical Science, Philips Healthcare, Montreal, Quebec, Canada

⁷School of Computing, Informatics, Decision Systems and Engineering, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA

⁺ these authors contributed equally to this work

1. ABSTRACT

Chronic manganese (Mn) exposure is associated with neuromotor and neurocognitive deficits, but the exact mechanism of Mn neurotoxicity is still unclear. With the advent of magnetic resonance imaging (MRI), *in-vivo* analysis of brain structures has become possible. Among different sub-cortical structures, the basal ganglia (BG) has been investigated as a putative anatomical biomarker in MR-based studies of Mn toxicity. However, previous investigations have yielded inconsistent results in terms of regional MR signal intensity changes. These discrepancies may be due to the subtlety of brain alterations caused by Mn toxicity, coupled to analysis techniques that lack the requisite detection power. Here, based on brain MRI, we apply a 3D surface-based morphometry method on 3 bilateral basal ganglia structures in school-age children chronically exposed to Mn through drinking water to investigate the effect of Mn exposure on brain anatomy. Our method successfully pinpointed significant enlargement of many areas of the basal ganglia structures, preferentially affecting the putamen. Moreover, these areas showed significant correlations with fine motor performance, indicating a possible link between altered basal ganglia neurodevelopment and declined motor performance in high Mn exposed children.

2. INTRODUCTION

Manganese (Mn) is an essential element that participates in daily metabolic activities in the human body, but that can be toxic when the dose exceeds Mn homeostasis^{1,2}. Studies have shown that Mn accumulation due to chronic occupational or environmental exposure may cause neuromotor and cognitive deficits^{3–6}. There are growing concerns about the risk of Mn childhood accumulation^{7–13}, as the immaturity of the biliary system results in higher Mn retention in both young animals and humans^{14,15}. In particular, Wasserman *et al.* investigated 10-year old children and found that children consuming drinking water with a high concentration of Mn had significantly lower IQ scores⁷. Bouchard *et al.*¹¹ further confirmed the adverse effects of Mn accumulation via drinking water on cognition, and these effects were observed in lower water Mn concentrations than in Wasserman *et al.*⁷. With the advent of MRI, efforts have been made to elucidate the neuro-substrates for Mn neurotoxicity. A brain diffusion tensor imaging (DTI) study of adult welders showed significant alterations of the corpus callosum (CC) and frontal white matter from long-term Mn exposure¹⁶. Task fMRI studies indicated additional brain activations in adult welders compared with controls, likely to ensure adequate motor performance and working memory^{17,18}. However, the exact mechanisms of Mn neurotoxicity are still not fully understood, especially in cases of exposure to Mn through drinking water, and the determination of dose-response level of Mn toxicity remains elusive¹. More dedicated studies on selective brain regions are needed to develop biomarkers of excessive Mn exposure and their association with clinical symptoms.

The basal ganglia (BG) consists of several important subcortical gray matter nuclei, and is thought to be the intersection where action and cognition meet¹⁹. Due to its involvement in several motor and cognitive cortical-subcortical loops,

BG dysfunctions often lead to disorders of motor initiation and inhibition, notably Parkinson's disease (PD)^{20,21}. Mn intoxication patients often show symptoms that resemble those of PD, therefore the BG has been targeted as a putative location for studies on manganese toxicity^{2,22}. Among the several sub-nuclei of the BG, the globus pallidus is thought to be the most affected, but inconsistent results have been reported. For instance, Hauster *et al.*²³, Fell *et al.*²⁴, Kafritsa *et al.*²⁵, and Ikeda *et al.*²⁶ found T1 hyperintensities in the globus pallidus in patients with elevated Mn blood concentrations due to chronic liver disease or long-term parenteral nutrition, while Shinotoh *et al.*²⁷, Kim *et al.*²⁸ as well as Aschner *et al.*²⁹ reported no BG T1 signal intensity alterations in patients with occupational Mn exposure or manganese intoxication secondary to iron deficiency anemia. In addition, Criswell *et al.* explored several BG subregions and found that intensity indices in the caudate, the anterior and posterior putamen and the globus pallidus were all correlated with the magnitude of Mn exposure³⁰. More interestingly, the combined global basal ganglia intensity index was more correlated with Mn exposure than the widely accepted pallidal index. The discrepancy in previous studies may be due to varied Mn toxicity levels, and methodologies that are either not powerful enough or whose results vary with MRI scanner settings. Thus, higher detection power techniques are required to better understand the relative vulnerability of the BG nuclei to Mn toxicity.

Here, for the first time, we apply a 3D surface-based morphometry analysis on 3 BG structures, including the putamen, the globus pallidus and the caudate, to investigate the neuroanatomic correlates of chronic childhood Mn exposure through drinking water. In the present study, we compare 10 high Mn exposure and 13 age matched low exposure school-age children, and aim to examine the differences associated with Mn exposure through drinking water. We previously assessed these children with the standard MRI procedure for Mn exposure, that is, evaluation of MRI signal intensity in the globus pallidus. We did not observe any hyperintensities

in the globus pallidus, as might be expected based on the literature on occupationally exposed individuals³¹, but rather, as detailed in our previous work, we observed significant hypointensities in the group of children with higher Mn exposure¹³. The significance of this finding is not clear, but might indicate neurological damages since the hypointensities correlated with poorer motor function¹³. Our study may provide new biomarkers for Mn neurotoxicity as well as neuro-substrates for the impaired motor performance associated with excessive Mn exposure.

3. RESULTS

Twenty-three children aged 9 to 15 (mean: 12.2 years) were grouped into 10 high Mn exposure and 13 age matched low exposure participants, according to the Mn concentration in their drinking water. Brain T1 MR images of all the subjects were acquired using a 3T Philips scanner. Three bilateral BG nuclei (the caudate, the putamen, and the globus pallidus) were manually traced on preprocessed and linearly aligned T1 images. In the presented dataset, no visible T1 intensity alterations were found in the BG in our participants. Thus, potential Mn depositions in the deep gray matter structures, if there were any, did not influence the differentiation of BG nuclei boundaries. Based on the binary segmentations, 3D surface mesh grids of the BG structures were constructed and registered using an in-house algorithm³². Manual segmentation of 3 bilateral BG nuclei and the corresponding 3D surfaces are shown in Fig. 1. This was followed by a traditional volume based analysis (VBA) and a multivariate tensor based morphometry (mTBM). Details can be found in the materials and methods section.

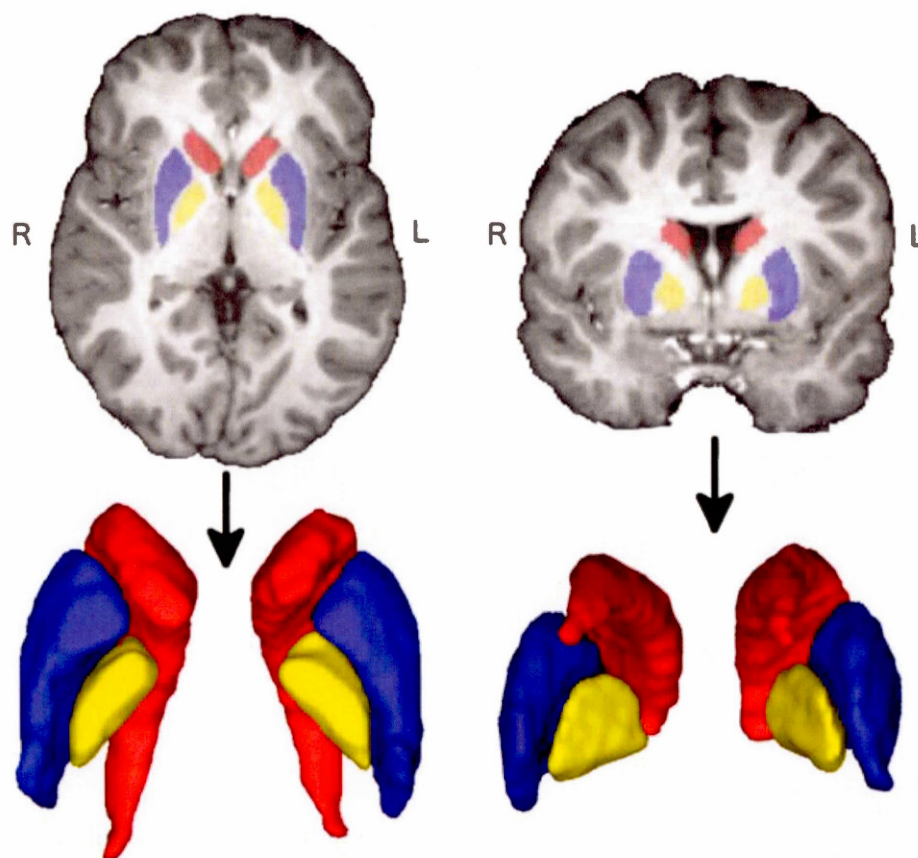


Figure 1. Illustration of segmentation and the corresponding 3D structures in axial and coronal views. Red, blue and yellow each represents the caudate, the putamen and the globus pallidus, respectively. None of the participants had observable hyper- or hypointensities in the basal ganglia.

Group analysis results using VBA and mTBM are shown in Table 1. Whole structure volumes are computed to provide an intuitive comparison of structure sizes between the low and high Mn exposure groups, while mTBM is more sensitive to regional alterations in structures. As we can see from Table 1, all the investigated BG structures (the putamen, the globus pallidus and the caudate) have average volumes that are slightly larger in the high Mn exposure group compared with those from the low Mn exposure group. However, none of these differences reach statistical significance. As for surface based morphometry, after structure-wise multiple comparisons correction, the bilateral putamen shows significant differences between

exposure groups, and the bilateral caudate and globus pallidus both show similar trends. We also run structure-wise permutation based statistical tests on both sides of the structures to correct for multiple comparisons in an exploratory analysis. We detect significant differences in the left putamen and trends in the right putamen as well as the left globus pallidus.

Table 1. Group difference results of traditional univariate volume based analyses (VBA), and multivariate tensor based morphometry (mTBM) analyses on left (*l*-), right (*r*-), and combined (*c*-) basal ganglia structures: Putamen (Put), Globus Pallidus (GP), Caudate (Cau). All the *p*-values are corrected for multiple comparisons using structure-wide permutation testing with 10,000 permutations^{48,49}. Significance is set at $p < 0.05$, and significant values are marked using**. Low *p*-values implying trends are marked using*.

Structures	Volumes (high exposure group)/mm ³	Volumes (low exposure group)/mm ³	<i>p</i> values VBA	<i>p</i> values mTBM
<i>l</i> -Put	5075.8 ± 216.6	4725.2 ± 648.3	0.1460	0.0067**
<i>r</i> -Put	4904.9 ± 311.5	4465.3 ± 1231.7	0.3686	0.1001*
<i>c</i> -Put	9980.7 ± 447.5	9190.5 ± 1607.9	0.1801	0.0121**
<i>l</i> -GP	1298.2 ± 119.1	1221.2 ± 148.8	0.2338	0.0767*
<i>r</i> -GP	1213.5 ± 133.1	1152.6 ± 116.1	0.1878	0.2453
<i>c</i> -GP	2511.7 ± 235.5	2373.9 ± 258.2	0.2046	0.1045*
<i>l</i> -Cau	4156.4 ± 346.0	3921.4 ± 477.7	0.1759	0.1663
<i>r</i> -Cau	4431.9 ± 344.4	4234.9 ± 573.2	0.3124	0.1171
<i>c</i> -Cau	8588.2 ± 609.5	8156.3 ± 1037.0	0.2232	0.1396

To visualize the type of alterations (i.e., enlargement or shrinkage) in surface based morphometry, we map the ratio of the mean determinants ($\det J$) of the two groups at each vertex (Fig. 2). Vertex-wise multivariate analyses based on the combination of 4 feature values (MAD and 3 eigenvalues of the logged deformation tensor) are also performed, and the corresponding *p*-value maps are shown in Fig. 3. While for several of the BG subnuclei (i.e., the right putamen and the left globus pallidus),

structure-wise p -values in Table 1 only show trends, significant clusters with evident enlargements are present in several sub-regions on the nuclei's surfaces.

As shown in Figs 2 and 3, several areas of the BG structures, notably the anterior aspect, are significantly enlarged. In the putamen, both the anterior and the posterior ends are larger in the high-exposure group, and broad surface areas show significant group differences in Fig. 3. In the globus pallidus, most of the significant clusters are larger in the high-exposure group, with the main significant clusters located in the left anterior side. In the caudate, we observe evidently larger anterior ends on the bilateral sides, and a smaller posterior end of the left side in the high-exposure group, though only few surface clusters reach significance.

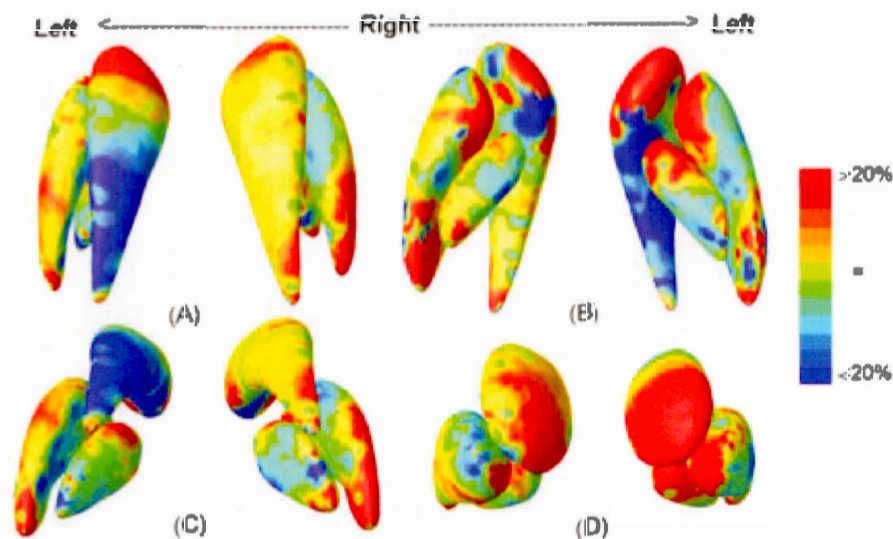


Figure 2. Mean ratio map of $detJ$ between high-exposed and low-exposed groups are displayed in four views: Superior (A), Inferior (B), Posterior (C), and Anterior (D). Areas in red represent an increase of $detJ$ in the high-exposed group compared with that in the low-exposed group, indicating an expansion of the corresponding areas. Areas in blue show a decrease $detJ$ in the high-exposed group compared with that in the low-exposed group, indicating a contraction of the corresponding areas.

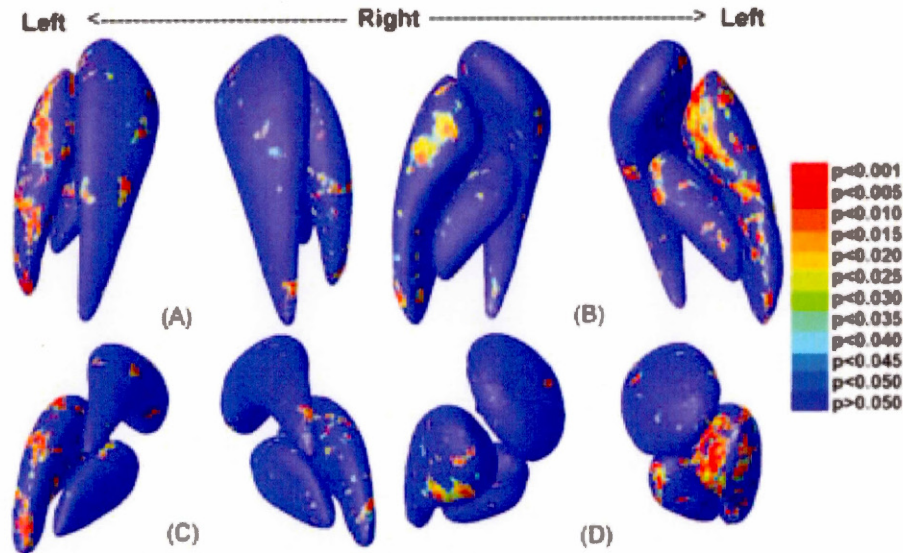


Figure 3. Statistical results of multivariate analysis are displayed in four views: Superior (A), Inferior (B), Posterior (C), and Anterior (D). Areas in colors other than deep blue represent vertex-wise significances of the multivariate analyses ($p < 0.05$).

Vertex-wise *detJ* from mTBM are also correlated with motor performance, specifically the Santa Ana Pegboard Test developed to assess fine motor function³³. In Figs 4 and 5, structural enlargement, notably the anterior aspect of the left putamen and the left caudate are negatively correlated with motor performance. Moreover, areas significantly correlated with motor performance largely overlap those shown in the group difference maps in Figs 2 and 3.

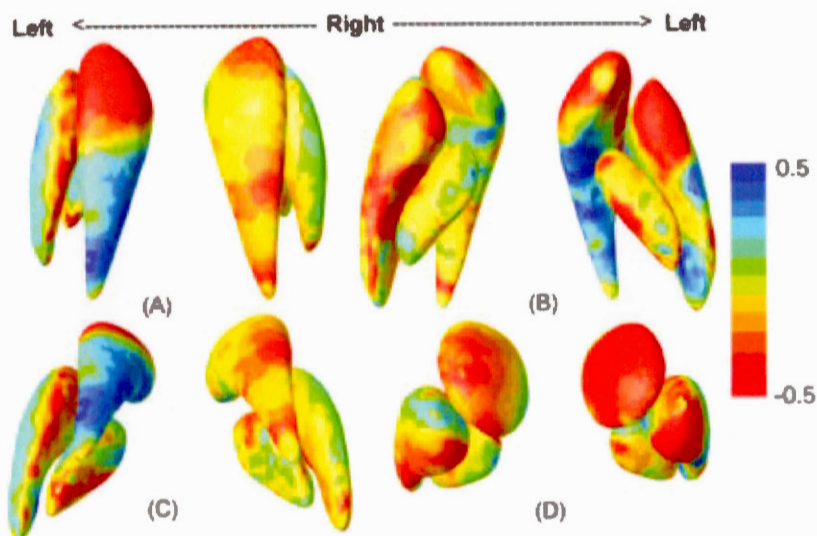


Figure 4. Vertex-wise correlation coefficients between vertex-wise detJ values with Santa Ana scores are displayed in four views: Superior (A), Inferior (B), Posterior (C), and Anterior (D). Areas in red colors represent a negative correlation between surface areas and motor performance, and vice versa for blue colors.

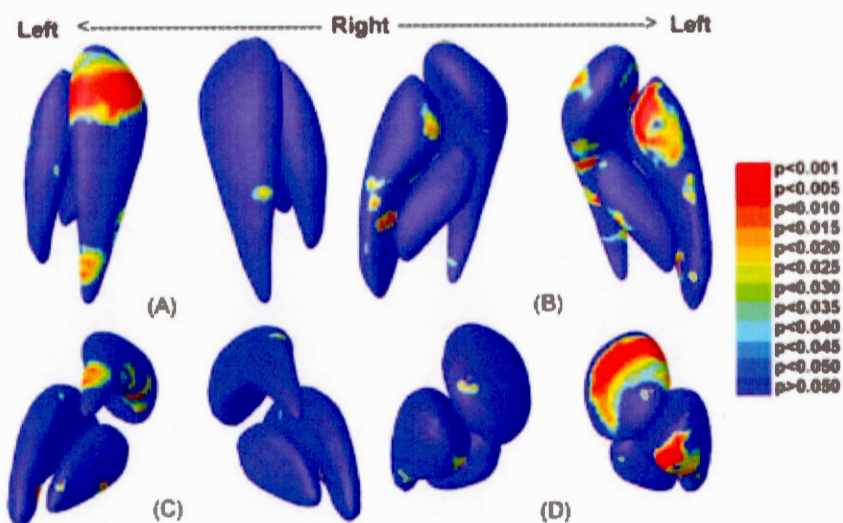


Figure 5. Correlation of vertex-wise detJ values with Santa Ana scores are displayed in four views: Superior (A), Inferior (B), Posterior (C), and Anterior (D). Areas in colors other than deep blue represent vertex-wise significances of the multivariate analyses ($p < 0.05$).

4. DISCUSSION

Here, we applied a MRI based 3D mTBM analysis on BG subnuclei to investigate BG morphometry alterations in the developing brain in response to long-term Mn exposure from drinking water. Statistical comparisons based on BG subnuclei volume did not detect any significant alterations. Using mTBM, we successfully detected significant enlargement in the putamen and trends of enlargement in the left globus pallidus. In addition, we correlated fine motor performance, based on Santa Ana test scores, with regional surface measurements of *det J*. Reduced motor performance was found to be significantly correlated with regional enlargement in anterior ends of the putamen, globus pallidus and caudate – the same areas that were also found to be significantly altered in the mTBM comparisons between Mn exposure groups. These results are in accordance with deficits in cognitive and neuromotor performance observed in these children from previous studies^{12,13}, and with a study showing that enlarged anterior BGs are associated with lower behavioral performance in pre-adolescent children³⁴.

Our findings demonstrated significant regional enlargement in BG subnuclei of Mn exposed children. Altered BG morphologies are significantly associated with poor motor performance in this population. Collectively, these results suggest that neuro-circuits within the motor loop are at risk in children with Mn exposure through drinking water.

Although there is still controversy regarding the exact mechanisms of Mn toxicity, growing focus has been directed to dysfunctions of the basal ganglia motor pathways^{27,35,36}. The striatum, including the caudate and the putamen, receive anatomical projections from the motor cortex and substantia nigra pars compacta and send out-puts via the globus pallidus, forming programming motor loops. The striatum and the globus pallidus are thought to be the primary targets of Mn accumulation in the brain². In particular, a positron emission tomography (PET) study on four patients

with chronic occupational Mn exposure proposed that Mn is likely to disrupt downstream BG dopaminergic output pathways²⁷. Criswell *et al.* investigated 20 asymptomatic welders exposed to Mn fumes, and reported reduced 6-[18F]fluoro-L-DOPA (FDOPA) PET uptake predominantly in the anterior striatum³⁵. A subsequent study on a patient with Mn accumulation in end-stage liver disease confirmed reduced FDOPA uptake in the caudate, and in the anterior and posterior putamen³⁶. In addition, a voxel based morphometry study reported volume reduction co-located to the globus pallidus³⁷, while other T1 intensity based studies on the globus pallidus reported inconsistent findings^{23–28}. Our current study extends these findings on the Mn-induced neuroanatomical changes in the BG subnuclei to children with exposure to Mn present in drinking water. Here, we detected evident enlargements in BG subnuclei, notably the left caudate, the whole putamen and the globus pallidus. Concurrent alterations in all three regions may imply disturbances in their shared BG motor pathways.

Support for the hypothesis of BG motor pathways disturbances also comes from our correlation analysis between BG shape measurements and fine motor performance. In a previous study in the same population¹³, three different motor measurements were tested, and Santa Ana Pegboard Test performances were the ones most correlated with Mn exposure. In line with this, in the presented study, enlargements in the anterior caudate and putamen were significantly correlated with Santa Ana scores. These are also consistent with the findings of Sandman *et al.*³⁴, in which anterior striatum changes were found to be significantly associated with poorer cognition in healthy pre-adolescent children. However, the current study is not powered to reveal disturbances in specific motor pathways (i.e. direct/indirect motor pathways, or the nigrostriatal pathways.). Future investigations integrating high angular resolution diffusion - weighted imaging (HARDI) tractography analysis on selected region of interest will be needed to refine our current findings.

While previous MRI studies of Mn neurotoxicity focused on occupational Mn exposure in adults, we are the first to investigate basal ganglia morphometry alterations in children with Mn exposure. Studies of Mn intoxication in adults have reported reduced gray matter volumes as well as reduced WM integrity³⁷. For instance, in a whole brain voxel-based morphometry analysis³⁷, brain volumes, notably the globus pallidus and cerebellar regions, were found to be reduced in occupationally Mn exposed welders. A region of interest study that was also performed on welders showed reduced apparent diffusion coefficient values in the globus pallidus and anterior putamen³⁰. The enlargement of bilateral BG structures in our study are opposite in direction to the reductions found in adults. The discrepancy may be due to the different age of the included subjects, coupled with different Mn exposure routes³⁷.

The brain undergoes important development from childhood to adolescence, and involves a complex sequence of neuronal growth and pruning^{38,39}. The interplay of external disturbances and changes in normal brain growth encodes specific brain morphometry, making the onset age of Mn neurotoxicity an important factor to consider in interpreting the results. Prior imaging studies of gray matter maturation showed increased synaptic pruning and reduced gray matter density in adolescents' brains^{39–42}. Consequences of disturbances of this process are not well understood, albeit certain association of enlargement and neurobehavioral measures were reported by some studies. For example, based on the correlation results from 50 pre-adolescent children, Sandman *et al.* proposed an enlargement of the basal ganglia as a possible bio-marker of developmental impairment, with all three basal ganglia nuclei involved, and the putamen being preferentially affected³⁴. In accordance with these findings, we detected significant enlargement in the basal ganglia, notably in the putamen. The enlargement of the caudate and putamen were also correlated with fine motor functions.

Alternatively, this enlargement pattern may be specific to Mn toxicity through drinking water. Researches on risk assessments of inhaled and ingested Mn reported quantitative differences of Mn tissue uptake via different dose routes⁴³. In particular, inhaled Mn contaminated dusts that bypass normal gastrointestinal control system likely bind to transferrin as trivalent Mn, and thus are hard to eliminate by the liver and are easily accumulated in the brain via transferrin receptors⁴³. Thus, the occupational Mn exposure investigated in previous studies may have a longer period of tissue uptake, and may eventually impact brain anatomy in a pattern different from other routes of Mn overexposure^{35,36}. In our previous study on the same population, T1 intensity indices were also found to be different from those of adult studies¹³. These results, collectively, may indicate alternative Mn neurotoxicity mechanisms in children with waterborne Mn exposure. However, these preliminary hypotheses need further validation, including pharmacokinetic data on more subjects with different pathways of Mn overexposure.

The limitations of our study are as follows: First, we relied on Mn concentration in drinking water to define exposure groups. Mn water concentration was much more associated with hair Mn concentration (an exposure biomarker to Mn) than dietary Mn intake in a larger study from which our current subjects were selected¹¹. However, it is possible that additional Mn exposure also came from air or food. Second, we did not explore the possible influence of other contaminants present in water. However, including iron concentrations in the regression model did not reduced the association between Mn concentration and the lower IQ scores, whereas other metals had very low concentrations (e.g. lead, arsenic). Third, our sample spans a range of ages from 9–15 years old, a period at which the brain is still rapidly developing, requiring the use of linear regression to control for the effect of age. Shaw *et al.* mapped the trajectory of BG development in 220 healthy subjects, and found that the growth of globus pallidus is close to linear⁴⁴. In the same study, the trajectory of the striatum was found to be approximately linear from 7 to 14 years

old, and the growth rate slows down afterward. In the current study, we have a total of 23 subjects, and only one of our subjects was over 14 years old at the time of scan. In order to avoid the over-fitting problem using nonlinear regression with a limited sample size, we adopted a simple linear regression to factor out the effect of age. This is recognized as one of the caveats of this study, and shall be optimized with better regression models in future larger datasets.

In the future, in addition to enrolling more subjects, we would also like to include more brain regions into our analysis. BG substructures investigated here are most likely the primary, but not the exclusive targets of Mn neurotoxicity. For example, alterations of the frontal cortex and corpus callosum have been reported in occupationally exposed adult welders¹⁶. These brain regions will be included in future.

5. METHODS

Brain T1-weighted MR images of 10 (mean age: 12.5, SD: 1.30 years) children with chronic exposure to Mn and 13 (mean age: 11.9, SD: 1.9 years) age matched controls were acquired with a 3T EPhilips Achieva X system. T1-weighted images were acquired using a 3D spoiled gradient-echo with inversion recovery preparation (repetition time (TR) = 8.1 ms, echo time (TE) = 3.7 ms, inversion time (TI) = 1005 ms, acquisition matrix = $240 \times 240 \times 160$, resolution = $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$, SENSE factor = 1.5). An 8-channel phased-array head coil was used for signal reception, and head motion was minimized using cushions. Sequence duration was 7.5 minutes.

Selection criteria: For this present MRI investigation, carried out in 2010–2012, we selected children based on the concentration of Mn in the tap water of their residence, as measured in the initial study. We enrolled 13 children with low and 10 children with high Mn concentration in their drinking water (<30 and $>100 \mu\text{g/L}$,

respectively). For each participant, an informed written consent was obtained from a parent, along with a written assent from the child. All MRI imaging was performed in accordance with guidelines and regulations of the Department of Radiology of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), using procedures that were approved by the Sainte-Justine Hospital, Notre-Dame Hospital and Université du Québec à Montréal research ethics committees. Written informed consent was obtained from the subject prior to the MR examination. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Mn concentration from the children in the low-exposure group ranged from 0.2 to 27 $\mu\text{g/L}$ (median = 0.9, SD = 9) and those in the high-exposure group ranged from 103 to 264 $\mu\text{g/L}$ (median = 145, SD = 54). Children from the two exposure groups were comparable in terms of age, sex, HOME scores, and full-scale IQ scores¹³, as shown in Table 2.

Subjects	Number	Median water Mn concentration ($\mu\text{g/L}$)	Age at scan	Gender	IQ	Santa Ana scores
Mn low exposure group	13	0.9 \pm 9	12.5 \pm 1.3	5M8F	101.3 \pm 9.1	36.9 \pm 7.6
Mn high exposure group	10	145 \pm 54	11.9 \pm 1.9	4M6F	105.0 \pm 10.8	30.2 \pm 5.9

Table 2. Demographics of our subjects.

Preprocessing

T1-weighted MR images for all the subjects are first bias corrected and skull stripped using the FSL software⁴⁵. The preprocessed T1 data are linearly registered to one of the randomly chosen controls⁴⁶. Three bilateral basal ganglia nuclei are manually traced on linearly aligned T1 images by a neuroradiology trainee using Insight Toolkit's SNAP program⁴⁷. The intra-rater percentage overlaps are 0.90 for the putamen, 0.91 for the globus pallidus, and 0.90 for the caudate. 3D surface representations of the 3 basal ganglia nuclei are constructed based on binary

segmentations, and mesh grids are then built on the surfaces using our in-house conformal mapping program³². Subsequently, constrained harmonic based registrations are performed between an intermediate surface and each of the surface models, to obtain a one-to-one correspondence between vertices³². Then, volume based analysis and surface based analysis are performed, as discussed in detail in the following section

Volume based analysis

Among the various shape analysis methods on subcortical gray matter, the whole volume based analysis is the most intuitive one. Although volume based comparisons are generally limited in terms of detection and localization, they may provide preliminary insights into which structures may be affected. Here, we calculate the volumes of the 3 bilateral basal ganglia nuclei, to detect gross volume changes prior to the fine grained surface based morphometry analysis. A univariate *t*-test is performed on the volumes of each structure, and 10,000 permutations are employed to avoid the normal distribution assumption^{48,49}. P-values for each of the tests are shown in Table 1.

Surface based analysis

We used several shape measurements in our multivariate tensor based analysis. The first is medial axial distance (MAD), which represents the distance from a given surface vertex to the medial axis and represents the shape's thickness at each point of its surface. The second is logged deformation tensor ($\log S$). Specifically, the registration between each subject's image and the template results in a displacement field u . For each indexed vertex on subject's surface, a Jacobian matrix $J = Id + \nabla u$ is computed, where Id is the identity matrix. In tensor-based morphometry, vertex-wise Jacobian matrices, or their derived functions are typically used as measurements in group analyses. In particular, the deformation tensor S ($S = JJ^T$), which can be

expressed as a 2D ellipse at the center of each grid cell, captures directional difference at the corresponding location on the surface area as compared to a template⁴⁸. The use of S largely preserves the information in shape changes, which is commonly lost when using the univariate determinant or trace of the Jacobian matrices ($\det J$ or $\text{tr}J$). To simplify computations, we use the logarithms of the deformation tensors ($\log S$) instead of S , such that the projected elements form a vector space where standard Euclidean space formulae can be applied⁵⁰.

According to our previous studies on populations with various age ranges^{32,49,51}, the combination of MAD and logged deformation tensor (MADMTBM) has shown highest detection power compared to the widely used MAD or determinant based morphometry analyses (which detect surface area changes without the directional information). Thus, in this study, the surface based morphometry was mainly carried out through MADMTBM measures. For each vertex on the surface, the feature vector was defined as the combined logged deformation tensor and radial distance (4×1).

To compare the direction of alterations, i.e. whether there is an enlargement or a shrinkage in the high Mn exposed group compared with low exposed controls, we map the ratio of the mean $\det J$ of the two groups at each vertex. The ratio maps are shown in Fig. 2. Furthermore, a multivariate analysis based on the 4 feature values (MAD) and 3 values of the deformation tensor matrix) is performed to test whether the alteration is significant or not.

As previously stated, our subjects from the two exposure groups were comparable in terms of age, sex, home observation for measurement of the environment (HOME) scores, and full-scale IQ scores¹³. However, the effect of brain growth on BG morphometry from childhood into adolescence is not negligible^{34,44}. Given the relatively large age range (from 9 to 15 years old) in our dataset, we use linear regression to factor out the effect of age. Linear regressions are carried out for each

of the channel within the feature vector separately. Following this, Hotelling's T^2 -tests are performed on the covaried feature vectors, as described in refs 33, 49 and 53.

Given the limited sample size of our study, we conduct vertex-wise permutation tests to avoid assuming a normal distribution. To do this, we shuffle the group labels and compare T^2 - values obtained as such with T^2 - values from the real data. For each vertex, 10,000 permutations are performed to assemble a null distribution of T^2 -values⁵³. Vertex-wise corrected p-value maps for BG are shown in Fig. 3. In addition, each structure has 15,000 vertices on its surface, thus is inevitably subjected to multiple comparison errors. As a result, we also conducted 10,000 permutations over the whole structure surface to obtain a single p - value corrected for multiple comparisons. The overall p-values after multiple comparison correction are shown in Table 1. Both correction methods have been validated in previous multivariate tensor based morphometry studies with limited sample sizes^{48,49,51}.

Correlation Analysis

Pearson's correlations are performed between mTBM measures of *detJ* and motor performance. Specifically, we use the Santa Ana Pegboard Test from the Neurobehavioral Core Test Battery to assess hand dexterity and coordination³³. Santa Ana scores were collected in our previous epidemiological study¹¹, and have been shown to be most correlated to Mn exposure in the GP¹³. The vertex-wise correlation coefficients are shown in Fig.4.

6. REFERENCES

1. Greger, J. Nutrition versus toxicology of manganese in humans: evaluation of potential biomarkers. *Neurotoxicology* 20, 205–212 (1998).
2. Crossgrove, J. & Zheng, W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR in Biomedicine* 17, 544–553 (2004).
3. Rodier, J. Manganese poisoning in moroccan miners. *British journal of industrial medicine* 12, 21 (1955).
4. Haynes, E. N. *et al.* Manganese exposure and neurocognitive outcomes in rural school-age children: the communities actively researching exposure study (ohio, usa). *Environmental health perspectives* 123, 1066 (2015).
5. Mergler, D. *et al.* Nervous system dysfunction among workers with long-term exposure to manganese. *Environmental research* 64, 151–180 (1994).
6. Roels, H. *et al.* Manganese exposure and cognitive deficits: a growing concern for manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* 33, 872–880 (2012).
7. Wasserman, G. A. *et al.* Water manganese exposure and children's intellectual function in araihar, bangladesh. *Environmental health perspectives* 124–129 (2006).
8. Bouchard, M. Hair manganese and hyperactive behaviors: Pilot study of school-age children exposed through tap water. *Epidemiology* 18, S164–S165 (2007).
9. Khan, K. *et al.* Manganese exposure from drinking water and children's classroom behavior in bangladesh. *Environmental health perspectives* 119, 1501 (2011).
10. Khan, K. *et al.* Manganese exposure from drinking water and children's academic achievement. *Neurotoxicology* 33, 91–97 (2012).
11. Bouchard, M. F. *et al.* Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. *Environmental health perspectives* 119, 138 (2011).
12. Oulhote, Y. *et al.* Neurobehavioral function in school-age children exposed to manganese in drinking water. *Environmental health perspectives* 122, 1343–1350 (2014).
13. Dion, L.-A. *et al.* MRI pallidal signal in children exposed to manganese in drinking water. *NeuroToxicology* 53, 124–131 (2016).
14. Keen, C. L. The effect of age on manganese uptake and retention from milk and infant formulas in rats. *J. Nutr* 116, 395–402 (1986).
15. Keen, C., Ensunsa, J. & Clegg, M. Manganese metabolism in animals and humans including the toxicity of manganese. *Metal ions in biological systems* 37, 89–121 (1999).

16. Kim, Y. *et al.* Altered white matter microstructural integrity revealed by voxel-wise analysis of diffusion tensor imaging in welders with manganese exposure. *Neurotoxicology* 32, 100–109 (2011).
17. Chang, Y. *et al.* Neuroplastic changes within the brains of manganese-exposed welders: recruiting additional neural resources for successful motor performance. *Occupational and environmental medicine* 67, 809–815 (2010).
18. Chang, Y. *et al.* Altered working memory process in the manganese-exposed brain. *Neuroimage* 53, 1279–1285 (2010).
19. Kawagoe, R., Takikawa, Y. & Hikosaka, O. Expectation of reward modulates cognitive signals in the basal ganglia. *Nature neuroscience* 1, 411–416 (1998).
20. Rafal, R. D., Walker, J. A., Posner, M. I. & Friedrich, F. J. Cognition and the basal ganglia separating mental and motor components of performance in parkinson's disease. *Brain* 107, 1083–1094 (1984).
21. Middleton, F. A. & Strick, P. L. Basal ganglia output and cognition: evidence from anatomical, behavioral, and clinical studies. *Brain and cognition* 42, 183–200 (2000).
22. Sigel, A., Sigel, H. & Sigel, R. K. Neurodegenerative diseases and metal ions. *Metal Ions in Life Sciences* 1, 281–320 (2006).
23. Hauser, R. A., Zesiewicz, T. A., Rosemurgy, A. S., Martinez, C. & Olanow, C. Manganese intoxication and chronic liver failure. *Annals of neurology* 36, 871–875 (1994).
24. Fell, J. *et al.* Manganese toxicity in children receiving long-term parenteral nutrition. *The Lancet* 347, 1218–1221 (1996).
25. Kafritsa, Y. *et al.* Long term outcome of brain manganese deposition in patients on home parenteral nutrition. *Archives of disease in childhood* 79, 263–265 (1998).
26. Ikeda, S. *et al.* Manganese deposition in the globus pallidus in patients with biliary atresia. *Transplantation* 69, 2339–2343 (2000).
27. Shinotoh, H. *et al.* Presynaptic and postsynaptic striatal dopaminergic function in patients with manganese intoxication a positron emission tomography study. *Neurology* 48, 1053–1055 (1997).
28. Kim, Y. *et al.* Blood manganese concentration is elevated in iron deficiency anemia patients, whereas globus pallidus signal intensity is minimally affected. *Neurotoxicology* 26, 107–111 (2005).
29. Aschner, J. L. *et al.* Neuroimaging identifies increased manganese deposition in infants receiving parenteral nutrition. *The American journal of clinical nutrition* 102, 1482–1489 (2015).

30. Criswell, S. R. *et al.* Basal ganglia intensity indices and diffusion weighted imaging in manganese-exposed welders. *Occupational and environmental medicine* 69, 437–443 (2012).
31. Jiang, Y. *et al.* Brain magnetic resonance imaging and manganese concentrations in red blood cells of smelting workers: search for biomarkers of manganese exposure. *Neurotoxicology* 28, 126–135 (2007).
32. Wang, Y. *et al.* Surface-based TBM boosts power to detect disease effects on the brain: An N = 804 ADNI study. *Neuroimage* 56, 1993–2010 (2011).
33. WHO Office of Occupational Health. Operational guide for the who neurobehavioral test battery (ntcb). *World Health Organization (WHO), Geneva* (1986).
34. Sandman, C. A. *et al.* Shape of the basal ganglia in preadolescent children is associated with cognitive performance. *NeuroImage* 0, 93–102 (2014).
35. Criswell, S. *et al.* Reduced uptake of [18f] fdopa pet in asymptomatic welders with occupational manganese exposure. *Neurology* 76, 1296–1301 (2011).
36. Criswell, S. R. *et al.* Reduced uptake of fdopa pet in end-stage liver disease with elevated manganese levels. *Archives of neurology* 69, 394–397 (2012).
37. Chang, Y. *et al.* Decreased brain volumes in manganese-exposed welders. *Neurotoxicology* 37, 182–189 (2013).
38. Gogtay, N. *et al.* Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8174–8179 (2004).
39. Giedd, J. N. Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1021, 77–85 (2004).
40. Sowell, E. R., Thompson, P. M., Tessner, K. D. & Toga, A. W. Mapping continued brain growth and gray matter density reduction in dorsal frontal cortex: Inverse relationships during postadolescent brain maturation. *The Journal of Neuroscience* 21, 8819–8829 (2001).
41. Sowell, E. R. *et al.* Mapping cortical change across the human life span. *Nature neuroscience* 6, 309–315 (2003).
42. Raznahan, A. *et al.* Longitudinal four-dimensional mapping of subcortical anatomy in human development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 1592–1597 (2014).
43. Andersen, M. E., Gearhart, J. M. & Clewell III, H. Pharmacokinetic data needs to support risk assessments for inhaled and ingested manganese. *Neurotoxicology* 20, 161–172 (1999).

44. Shaw, P. *et al.* Mapping the development of the basal ganglia in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 53, 780–789 (2014).
45. Jenkinson, M., Beckmann, C. F., Behrens, T. E., Woolrich, M. W. & Smith, S. M. Fsl. *Neuroimage* 62, 782–790 (2012).
46. Jenkinson, M., Bannister, P., Brady, M. & Smith, S. Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images. *Neuroimage* 17, 825–841 (2002).
47. Zhang, H., Yushkevich, P. A., Alexander, D. C., Gee, J. C. *et al.* Deformable registration of diffusion tensor mr images with explicit orientation optimization. *Medical image analysis* 10, 764–785 (2006).
48. Lepore, F. *et al.* Generalized tensor-based morphometry of hiv/aids using multivariate statistics on deformation tensors. *Medical Imaging, IEEE Transactions on* 27, 129–141 (2008).
49. Lao, Y. *et al.* Thalamic alterations in preterm neonates and their relation to ventral striatum disturbances revealed by a combined shape and pose analysis. *Brain Structure and Function* 1–20 (2014).
50. Arsigny, V., Fillard, P., Pennec, X. & Ayache, N. Log-euclidean metrics for fast and simple calculus on diffusion tensors. *Magnetic resonance in medicine* 56, 411–421 (2006).

7. ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to acknowledge the participants and their families who gave their time and traveled to Montreal to help us carry out the study. We are grateful for Réseau en Bio-imagerie du Québec (RBIQ) and the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS) for funding this study.

8. AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

D.SA., N.L., Y.L., and M.B. conceived and designed the experiments, Y.L., L.D. and G.R. conducted the experiments, Y.L. and D.SA. analyzed the results. G.G. and M.B. contributed materials. Y.W. contributed analysis tools. Y.L., N.L., and D.SA. wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

9. COMPETING FINANCIAL INTEREST

The author(s) declare no competing financial interests.

ANNEXE B

**Questionnaires sur la consommation en eau, sur l'historique de résidence, sur
le traitement domestique de l'eau et questionnaire général.**

Questionnaire sur la consommation en eau

Nom de l'interviewer : _____

Date : _____

Ce questionnaire traite de votre consommation d'eau durant le dernier MOIS.

NOTES à l'interviewer:

- 1 verre = 8 oz. , 1 tasse = 6 oz.

- Pour les questions qui commencent par « L'eau utilisée pour préparer... », le deuxième choix « eau directement du robinet » réfère à l'eau prise et utilisée directement du robinet (donc qui n'est pas filtrée avec une carafe filtrante), même s'il y a un filtre permanent sur le robinet ou un filtre à l'arrivée d'eau principale)

B1 à B4 . À la maison durant le mois précédent, combien de **verres d'eau** avez-vous bu des sources suivantes?

Source d'eau	Note à l'interviewer	Aucun 0	Nombre de fois	Jour (J) Semaine (S) Mois (M)	Refus 97	NSP 98
B1. Eau embouteillée	<i>« eau embouteillée » fait référence à l'eau achetée et non à l'eau du robinet qui a été embouteillée</i>					
B2. Eau du robinet filtrée par une carafe filtrante (tel un	<i>cette question n'inclut pas la consommation d'eau provenant de la préparation</i>					

appareil Brita®)	<i>de jus, breuvage, etc</i>					
B3. Eau du robinet, qui n'a pas été filtrée par une carafe filtrante	<i>cette question n'inclut pas la consommation d'eau provenant de la préparation de jus, breuvage, etc</i>					
B4. Eau du robinet d'appoint	<i>Ce robinet est celui qui a été installé à côté du robinet typique et qui est lié à un système de filtrage</i>					

B5. À la maison durant le mois précédent, combien de fois avez-vous bu de l'eau durant la nuit ?

_____ par jour

()₀ Aucun – Passer à la Q. B7

_____ par semaine

()₉₇ Refus – Passer à la Q. B7

_____ par mois

()₉₈ NSP – Passer à la Q. B7

B6. L'eau utilisée pour boire durant la nuit était :

()₁ de l'eau en bouteille

()₅ Autre (spécifier, _____)

()₂ de l'eau directement du robinet

()₉₇ Refus

()₃ de l'eau d'une carafe filtrante

()₉₈ NSP

()₄ de l'eau du robinet d'appoint

()₉₉ Non-applicable

B7. À la maison durant le mois précédent, combien de verres de **jus, breuvage aux fruits, ou thé glacé** préparés avec du concentré ou de la poudre (ex., Kool-aid®, Tang®) et de l'eau avez-vous bus ?

- | | |
|-------------------|--|
| _____ par jour | () ₀ Aucun – Passer à la Q. B10 |
| _____ par semaine | () ₉₇ Refus – Passer à la Q. B10 |
| _____ par mois | () ₉₈ NSP – Passer à la Q. B10 |

B8. L'eau utilisée pour préparer le **jus, breuvage aux fruits, ou thé glacé** était :

- | | |
|--|---|
| () ₁ de l'eau en bouteille | () ₅ Autre (spécifier, _____) |
| () ₂ de l'eau directement du robinet | () ₉₇ Refus |
| () ₃ de l'eau d'une carafe filtrante | () ₉₈ NSP |
| () ₄ de l'eau du robinet d'appoint | () ₉₉ Non-applicable |

B9. À la maison durant le mois précédent, combien de tasses de **chocolat chaud** préparé avec de l'eau avez-vous bues ?

- | | |
|-------------------|--|
| _____ par jour | () ₀ Aucun – Passer à la Q. B12 |
| _____ par semaine | () ₉₇ Refus – Passer à la Q. B12 |
| _____ par mois | () ₉₈ NSP – Passer à la Q. B12 |

B10. L'eau utilisée pour préparer le **chocolat chaud** était :

- | | |
|--|---|
| () ₁ de l'eau en bouteille | () ₅ Autre (spécifier, _____) |
| () ₂ de l'eau directement du robinet | () ₉₇ Refus |
| () ₃ de l'eau d'une carafe filtrante | () ₉₈ NSP |
| () ₄ de l'eau du robinet d'appoint | () ₉₉ Non-applicable |

B11. À la maison durant le mois précédent, combien de fois avez-vous mangé de la **soupe (en sachet, en conserve, faite maison)** qui a été préparée avec de l'eau ?

- | | |
|-------------------|--|
| _____ par jour | () ₀ Aucun – Passer à la Q. B14 |
| _____ par semaine | () ₉₇ Refus – Passer à la Q. B14 |
| _____ par mois | () ₉₈ NSP – Passer à la Q. B14 |

B12. L'eau utilisée pour préparer la **soupe** était :

- | | |
|--|---|
| () ₁ de l'eau en bouteille | () ₅ Autre (spécifier, _____) |
| () ₂ de l'eau directement du robinet | () ₉₇ Refus |
| () ₃ de l'eau d'une carafe filtrante | () ₉₈ NSP |
| () ₄ de l'eau du robinet d'appoint | () ₉₉ Non-applicable |

B13. À la maison durant le mois précédent, combien de fois avez-vous mangé des **céréales chaudes** (ex. : gruau) qui ont été préparées avec de l'eau ?

- | | |
|-------------------|--|
| _____ par jour | () ₀ Aucun – Passer à la Q. B20 |
| _____ par semaine | () ₉₇ Refus – Passer à la Q. B20 |
| _____ par mois | () ₉₈ NSP – Passer à la Q. B20 |

B14. L'eau utilisée pour préparer les **céréales chaudes** était :

- | | |
|--|---|
| () ₁ de l'eau en bouteille | () ₅ Autre (spécifier, _____) |
| () ₂ de l'eau directement du robinet | () ₉₇ Refus |
| () ₃ de l'eau d'une carafe filtrante | () ₉₈ NSP |
| () ₄ de l'eau du robinet d'appoint | () ₉₉ Non-applicable |

B15. Durant le mois précédent, combien de fois avez-vous mangé du **gâteau, des biscuits, des brownies, et/ou des muffins** qui ont été faits à la maison et préparés avec de l'eau ? (*Note à l'interviewer: cette question réfère au gâteau, biscuits, etc. qui ont été préparés à la maison du ou de la participant (e)*)

- | | |
|-------------------|--|
| _____ par jour | () ₀ Aucun – Passer à la Q. B33 |
| _____ par semaine | () ₉₇ Refus – Passer à la Q. B33 |
| _____ par mois | () ₉₈ NSP – Passer à la Q. B33 |

B16. L'eau utilisée pour préparer le gâteau, les biscuits, les *brownies*, et/ou les muffins était :

- | | |
|--|--|
| () ₁ de l'eau en bouteille | () ₂ de l'eau directement du robinet |
|--|--|

- ()₃ de l'eau d'une carafe filtrante ()₉₇ Refus
 ()₄ de l'eau du robinet d'appoint ()₉₈ NSP
 ()₅ Autre (spécifier, _____) ()₉₉ Non-applicable

B17. Durant le mois précédent, combien de fois avez-vous mangé du **Jell-O® fait à la maison** et préparé avec de l'eau ? (*Note à l'interviewer: cette question réfère au Jell-O® qui a été préparé à la maison du ou de la participant (e)*)

- _____ par jour ()₀ Aucun – Passer à la Q. B35
 _____ par semaine ()₉₇ Refus – Passer à la Q. B35
 _____ par mois ()₉₈ NSP – Passer à la Q. B35

B18. L'eau utilisée pour préparer le **Jell-O®** était :

- ()₁ de l'eau en bouteille ()₅ Autre (spécifier, _____)
 ()₂ de l'eau directement du robinet ()₉₇ Refus
 ()₃ de l'eau d'une carafe filtrante ()₉₈ NSP
 ()₄ de l'eau du robinet d'appoint ()₉₉ Non-applicable

B19. Durant le mois précédent, combien de fois avez-vous mangé des **popsicles faits à la maison** et préparés avec de l'eau ? (*Note à l'interviewer: cette question réfère aux popsicles qui ont été préparés à la maison du ou de la participant (e)*)

- _____ par jour ()₀ Aucun – Passer à la Q. B37
 _____ par semaine ()₉₇ Refus – Passer à la Q. B37
 _____ par mois ()₉₈ NSP – Passer à la Q. B37

B20. L'eau utilisée pour préparer les **popsicles** était :

- ()₁ de l'eau en bouteille ()₅ Autre (spécifier, _____)
 ()₂ de l'eau directement du robinet ()₉₇ Refus
 ()₃ de l'eau d'une carafe filtrante ()₉₈ NSP
 ()₄ de l'eau du robinet d'appoint ()₉₉ Non-applicable

B21. Durant le mois précédent, combien de fois avez-vous mangé des **sauces (sauce pour pâtes, gravy, sauce barbecue) faites à la maison** et préparées avec de l'eau ?

- _____ par jour _____ par semaine

_____ par mois

()₀ Aucun – Passer à la Q. B39

()₉₇ Refus – Passer à la Q. B39

()₉₈ NSP – Passer à la Q. B39

B22. L'eau utilisée pour préparer les **saucés** était :

()₁ de l'eau en bouteille

()₂ de l'eau directement du robinet

()₃ de l'eau d'une carafe filtrante

()₄ de l'eau du robinet d'appoint

()₅ Autre (spécifier, _____)

()₉₇ Refus

()₉₈ NSP

()₉₉ Non-applicable

B23. Durant le mois précédent, combien de fois avez-vous mangé des **crêpes ou des gaufres faites à la maison** et préparées avec de l'eau ? (*Note à l'interviewer: cette question réfère aux crêpes et gaufres qui ont été préparées entièrement ou à partir d'un mélange en poudre à la maison du ou de la participant (e)*)

_____ par jour

_____ par semaine

_____ par mois

()₀ Aucun – Passer à la Q. C1

()₉₇ Refus – Passer à la Q. C1

()₉₈ NSP – Passer à la Q. C1

B24. L'eau utilisée pour préparer les crêpes et les gaufres était :

()₁ de l'eau en bouteille

()₂ de l'eau directement du robinet

()₃ de l'eau d'une carafe filtrante

()₄ de l'eau du robinet d'appoint

()₅ Autre (spécifier, _____)

()₉₇ Refus

()₉₈ NSP

()₉₉ Non-applicable

Commentaires de l'interviewer :

Questionnaire sur l'historique de résidence

Nom de l'interviewer : _____

Date : _____

1. Habitez-vous la même maison que lorsque nous nous sommes vus dans le cadre de l'étude Édu-Mango?

- | | |
|--|---|
| <input type="radio"/> ₀ Non | <input type="radio"/> ₉₇ Refus |
| <input type="radio"/> ₁ Oui – <i>Aller à la Q.2</i> | <input type="radio"/> ₉₈ NSP |

2. Combien de semaines par année il/elle habite à l'extérieur de la résidence (vacances, visite) ?

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> ₀ Aucune | <input type="radio"/> ₅ 9 à 10 semaines |
| <input type="radio"/> ₁ 1 à 2 semaines | <input type="radio"/> ₆ 10 et plus |
| <input type="radio"/> ₂ 3 à 4 semaines | <input type="radio"/> ₉₇ Refus |
| <input type="radio"/> ₃ 5 à 6 semaines | <input type="radio"/> ₉₈ NSP |
| <input type="radio"/> ₄ 7 à 8 semaines | |

3. Depuis qu'il/elle habite à cette résidence, y a-t-il eu des changements de l'approvisionnement en eau ?

- | | |
|--|---|
| <input type="radio"/> ₀ Non | <input type="radio"/> ₉₇ Refus |
| <input type="radio"/> ₁ Oui | <input type="radio"/> ₉₈ NSP |

5.1. Si oui, préciser _____

4. Est-ce que l'enfant habite à temps partagé dans un autre domicile?

- | | |
|--|---|
| <input type="radio"/> ₀ Non | <input type="radio"/> ₉₇ Refus |
| <input type="radio"/> ₁ Oui | <input type="radio"/> ₉₈ NSP |

4.1. Quel est le type d'approvisionnement en eau de cet autre domicile?

()₁ Puits

()₉₇ Refus

()₂ Aqueduc

()₉₈ NSP

4.2. Dans quelle municipalité est situé cet autre domicile? _____

Commentaires de l'interviewer :

Questionnaire sur le traitement domestique de l'eau

Nom de l'interviewer : _____

Date : _____

Section B- Utilisation et traitement domestique de l'eau

B1. Utilisez-vous un mode de filtration de l'eau ?

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> ₀ Non - <i>Aller à la Q.B9</i> | <input type="checkbox"/> ₉₇ Refus |
| <input type="checkbox"/> ₁ Oui – <i>Voir l'appareil</i> | <input type="checkbox"/> ₉₈ NSP |

B1.1 Carafe filtrante

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> ₀ Non | <input type="checkbox"/> ₉₇ Refus |
| <input type="checkbox"/> ₁ Oui | <input type="checkbox"/> ₉₈ NSP |

B8.1.1. Préciser le modèle, _____

B1.2. Filtre au charbon activé (autre qu'une carafe filtrante)

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> ₀ Non | <input type="checkbox"/> ₉₇ Refus |
| <input type="checkbox"/> ₁ Oui | <input type="checkbox"/> ₉₈ NSP |

B1.3. Filtre aux oxydes d'aluminium

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> ₀ Non | <input type="checkbox"/> ₉₇ Refus |
| <input type="checkbox"/> ₁ Oui | <input type="checkbox"/> ₉₈ NSP |

B1.4. Filtre au sable vert

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> ₀ Non | <input type="checkbox"/> ₉₇ Refus |
| <input type="checkbox"/> ₁ Oui | <input type="checkbox"/> ₉₈ NSP |

B1.5. Filtre pour les sédiments

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> ₀ Non | <input type="checkbox"/> ₉₇ Refus |
| <input type="checkbox"/> ₁ Oui | <input type="checkbox"/> ₉₈ NSP |

B1.6. Système d'adoucissement (filtre au sel, résines échangeuses d'ions)

()₀ Non ()₉₇ Refus

()₁ Oui ()₉₈ NSP

B1.7. Autres filtres, précisez, _____

B2. Appliquez-vous d'autres traitements ?

()₀ Non – *Aller à la Q.B10* ()₉₇ Refus

()₁ Oui – *Voir l'appareil* ()₉₈ NSP

B2.1. Chloration

()₀ Non ()₉₇ Refus

()₁ Oui ()₉₈ NSP

B2.2. Ultraviolets

()₀ Non ()₉₇ Refus

()₁ Oui ()₉₈ NSP

B2.3. Ozonation

()₀ Non ()₉₇ Refus

()₁ Oui ()₉₈ NSP

B2.4. Distillation

()₀ Non ()₉₇ Refus

()₁ Oui ()₉₈ NSP

B2.5. Osmose inversée

()₀ Non ()₉₇ Refus

()₁ Oui ()₉₈ NSP

B2.6. Autres traitements, précisez, _____

B3. Endroit où s'effectue le traitement ?

- ☐ ₁ Arrivée d'eau principale ☐ ₄ Autres (Préciser, _____)
☐ ₂ Au robinet ☐ ₉₇ Refus
☐ ₃ Au robinet d'appoint ☐ ₉₈ NSP

B4. L'entretien du moyen de traitement est-il conforme aux instructions du fournisseur ?

- ☐ ₀ Non ☐ ₉₇ Refus
☐ ₁ Oui ☐ ₉₈ NSP

B4.1. S'il y a lieu, à quelle fréquence ? _____

B4.2 Faites-vous ré analyser votre eau périodiquement ?

Commentaires de l'interviewer :

Questionnaire général

1. Quel est votre lien avec _____ (prénom)?

()₁ Mère

()₂ Père

()₃ Autre: _____

2. Diriez-vous que _____ (prénom) est....

()₁ Non-pubère

()₉₈ Ne sais pas

()₂ Pré-pubère

()₃ Pubère

3. Est-ce que _____ (prénom) a déjà perdu connaissance?

()₀ Non

()₉₈ Ne sais pas

()₁ Oui → 46.1 Pendant combien de temps? _____

4. Est-ce que _____ (prénom) a déjà eu une commotion cérébrale?

()₀ Non

()₉₈ Ne sais pas

()₁ Oui

4.1 Y a-t-il eu des séquelles ? ()₀ Non

()₁ Oui → 46.3 Lesquelles?

5. Est-ce que _____ (prénom) a eu un autre problème de santé ou un accident qui l'affecte toujours aujourd'hui?

()₀ Non

()₉₈ Ne sais pas

()₁ Oui → 5.1 Lequel ou lesquels et depuis combien de temps (ou à quel moment le problème est-il survenu?)

6. Est-ce que _____ (prénom) a déjà subi une anesthésie générale?

()₀ Non

()₉₈ Ne sais pas

()₁ Oui → 49.1 À combien de reprises? _____

7. Est-ce que _____ (prénom) prend des médicaments prescrits par un médecin (sur ordonnance), sur une base régulière? Demander de montrer les médicaments

()₀ Non

()₁ Oui → 7.1 Quel(s) médicament(s) prend-il ?

_____ À quelle fréqu.? _____ auj.? _____ heure : _____

_____ À quelle fréqu.? _____ auj.? _____ heure : _____

_____ À quelle fréqu.? _____ auj.? _____ heure : _____

_____ À quelle fréqu.? _____ auj.? _____ heure : _____

8. Est-ce que _____ (prénom) prend des médicaments naturels, des vitamines ou des suppléments alimentaires, sur une base régulière? Demander de montrer les médicaments; noter la quantité de manganèse

()₀ Non

()₁ Oui → 8.1 Quel(s) médicament(s) prend-il ?

_____ À quelle fréqu.? _____ auj.? _____ heure : _____

_____ À quelle fréqu.? _____ auj.? _____ heure : _____

_____ À quelle fréqu.? _____ auj.? _____ heure : _____

_____ À quelle fréqu.? _____ auj.? _____ heure : _____

9. Bénéficie-t-il ou a-t-il déjà bénéficié du soutien d'un orthopédagogue, orthophoniste, éducateur spécialisé ou un autre professionnel (de l'école ou à l'extérieur) depuis notre rencontre dans le cadre du projet Édu-Mango?

()₀ Non

()₁ Oui → 9.1 Le ou lesquels? _____

9.2 Pendant quelle(s) période(s)?

9.3 Pour quelle(s) raison(s)?

10. Est-ce qu'un professionnel de la santé (psychologue, médecin, psychiatre) a déjà dit que _____ (prénom) souffrait de....

10.1 Déficit d'attention

()₀ Non

()₉₈ Ne sais pas

()₁ Oui

10.2 Hyperactivité

()₀ Non

()₉₈ Ne sais pas

()₁ Oui

10. Troubles émotifs, psychologiques ou nerveux

()₀ Non

()₉₈ Ne sais pas

()₁ Oui

BIBLIOGRAPHIE

- Andersen, M. E., Gearhart, J. M., & Clewell, H. J. (1999). Pharmacokinetic data needs to support risk assessments for inhaled and ingested manganese. *NeuroToxicology*, 20, 161-171.
- Arora, M., Bradman, A., Austin, C., Vedar, M., Holland, N., Eskenazi, B., & Smith, D. R. (2012). Determining fetal manganese exposure from mantle dentine of deciduous teeth. *Environ Sci Technol*, 46(9), 5118-5125.
- Aschner, M., Erikson, K. M., & Dorman, D. C. (2005). Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol*, 35(1), 1-32.
- ATSDR. (2012). Toxicological profile for manganese. Atlanta, GA, United States.: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR Child Health Workgroup. (1997). Healthy Children- Toxic Environments: Acting on the vulnerability of children who dwell near hazardous waste sites. Atlanta, GA, United States.
- Baldwin, M., Bouchard, M. F., Larribe, F., & Mergler, D. (2008). Past occupational exposure to airborne manganese in a manganese alloy plant. *J Occup Environ Hyg*, 5(7), 426-437.
- Bhang, S.-Y., Cho, S.-C., Kim, J.-W., Hong, Y.-C., Shin, M.-S., Yoo, H. J., . . . Kim, B.-N. (2013). Relationship between blood manganese levels and children's attention, cognition, behavior, and academic performance- A nationwide cross-sectional study. *Environmental Research*, 126(0), 9-16.
- Bouchard, M. F., Laforest, F., Vandelac, L., Bellinger, D., & Mergler, D. (2007). Hair manganese and hyperactive behaviors: pilot study of school-age children exposed through tap water. *Environ Health Perspect*, 115(1), 122-127.
- Bouchard, M. F., Mergler, D., Baldwin, M., Panisset, M., Bowler, R. M., & Roels, H. A. (2007). Neurobehavioral functioning after cessation of manganese exposure: a follow-up after 14 years. *Am J Ind Med*, 50(11), 831-840.
- Bouchard, M. F., Mergler, D., Baldwin, M., Panisset, M., & Roels, H. A. (2007). Neuropsychiatric symptoms and past manganese exposure in a ferro-alloy plant. *NeuroToxicology*, 28(2), 290-297.
- Bouchard, M. F., Mergler, D., Baldwin, M. E., & Panisset, M. (2008). Manganese cumulative exposure and symptoms: a follow-up study of alloy workers. *NeuroToxicology*, 29(4), 577-583.
- Bouchard, M. F., Sauve, S., Barbeau, B., Legrand, M., Brodeur, M., Bouffard, T., . . . Mergler, D. (2011). Intellectual Impairment in School-Age Children Exposed to Manganese from Drinking Water. *Environ Health Perspect*, 119(1), 138-143.

- Bowler, R. M., Gysens, S., Diamond, E., Nakagawa, S., Drezgic, M., & Roels, H. A. (2006). Manganese exposure: Neuropsychological and neurological symptoms and effects in welders. *NeuroToxicology*, 27(3), 315-326.
- Bowler, R. M., Koller, W., & Schulz, P. E. (2006). Parkinsonism due to manganism in a welder: neurological and neuropsychological sequelae. *NeuroToxicology*, 27(3), 327-332.
- Bowler, R. M., Mergler, D., Sassine, M. P., Larribe, F., & Hudnell, K. (1999). Neuropsychiatric effects of manganese on mood. *NeuroToxicology*, 20(2-3), 367-378.
- Brna, P., Gordon, K., Dooley, J. M., & Price, V. (2011). Manganese Toxicity in a Child With Iron Deficiency and Polycythemia. *J Child Neurol*, 26(7), 891-894.
- Carvalho, C. F., Menezes-Filho, J. A., Matos, V. P., Bessa, J. R., Coelho-Santos, J., & Viana, G. F. (2014). Elevated airborne manganese and low executive function in school-aged children in Brazil. *Neurotoxicology*, 45, 301-308.
- Cersosimo, M. G., & Koller, W. C. (2006). The diagnosis of manganese-induced parkinsonism. *NeuroToxicology*, 27(3), 340-346.
- Chang, Y., Jin, S.-U., Kim, Y., Shin, K. M., Lee, H. J., Kim, S. H., . . . Lee, H. (2013). Decreased brain volumes in manganese-exposed welders. *NeuroToxicology*, 37(0), 182-189.
- Chang, Y., Kim, Y., Woo, S.-T., Song, H.-J., Kim, S. H., Lee, H., . . . Jeong, K. S. (2009). High signal intensity on magnetic resonance imaging is a better predictor of neurobehavioral performances than blood manganese in asymptomatic welders. *NeuroToxicology*, 30(4), 555-563.
- Chang, Y., Lee, J.-J., Seo, J.-H., Song, H.-J., Kim, J.-H., Bae, S.-J., . . . Kim, Y. (2010). Altered working memory process in the manganese-exposed brain. *NeuroImage*, 53(4), 1279-1285.
- Chang, Y., Woo, S. T., Lee, J. J., Song, H. J., Lee, H. J., Yoo, D. S., . . . Kim, Y. (2009). Neurochemical changes in welders revealed by proton magnetic resonance spectroscopy. *NeuroToxicology*, 30(6), 950-957.
- Chen, P., Parmalee, N., & Aschner, M. (2014). Genetic factors and manganese-induced neurotoxicity. *Front Genet*, 5, 265.
- Choi, D. S., Kim, E. A., Cheong, H. K., Khang, H. S., Ryoo, J. W., Cho, J. M., . . . Park, I. (2007). Evaluation of MR signal index for the assessment of occupational manganese exposure of welders by measurement of local proton T1 relaxation time. *NeuroToxicology*, 28(2), 284-289.
- Chung, S. E., Cheong, H. K., Ha, E. H., Kim, B. N., Ha, M., & Kim, Y. (2015). Maternal blood manganese and early neurodevelopment: The Mothers and Children's Environmental Health (MOCEH) Study. *Environ Health Perspect*, 123.
- Claus Henn, B., Ettinger, A. S., Schwartz, J., Téllez-Rojo, M. M., Lamadrid-Figueroa, H., & Hernández-Avila, M. (2010). Early postnatal blood manganese levels and children's neurodevelopment. *Epidemiology*, 21.
- Claus Henn, B., Schnaas, L., Ettinger, A. S., Schwartz, J., Lamadrid-Figueroa, H., & Hernández-Avila, M. (2012). Associations of early childhood manganese and lead coexposure with neurodevelopment. *Environ Health Perspect*, 120.

- Coetzee, D. J., McGovern, P. M., Rao, R., Harnack, L. J., Georgieff, M. K., & Stepanov, I. (2016). Measuring the impact of manganese exposure on children's neurodevelopment: advances and research gaps in biomarker-based approaches. *Environmental Health*, 15(1), 91.
- Couper, J. (1837). On the effects of black oxide of manganese when inhaled into the lungs. *British Annals of Medicine*, 1, 41-42.
- Criswell, S. R., Nelson, G., Gonzalez-Cuyar, L. F., Huang, J., Shimony, J. S., Checkoway, H., . . . Racette, B. A. (2015). Ex vivo magnetic resonance imaging in South African manganese mine workers. *NeuroToxicology*, 49, 8-14.
- Criswell, S. R., Perlmutter, J. S., Huang, J. L., Golchin, N., Flores, H. P., Hobson, A., . . . Racette, B. A. (2012). Basal ganglia intensity indices and diffusion weighted imaging in manganese-exposed welders. *Occup Environ Med*, 69(6), 437-443.
- Crossgrove, J., & Zheng, W. (2004). Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed*, 17(8), 544-553.
- Dion, L.-A., Bouchard, M. F., Sauvé, S., Barbeau, B., Tucholka, A., Major, P., . . . Saint-Amour, D. (2016). MRI pallidal signal in children exposed to manganese in drinking water. *NeuroToxicology*, 53, 124-131.
- Dorman, D. C., Struve, M. F., Wong, B. A., Dye, J. A., & Robertson, I. D. (2006). Correlation of brain magnetic resonance imaging changes with pallidal manganese concentrations in rhesus monkeys following subchronic manganese inhalation. *Toxicol Sci*, 92(1), 219-227.
- Dubuc, B. Le cerveau à tous les niveaux. *Le cortex moteur*. Retrieved from http://lecerveau.mcgill.ca/flash/a/a_06/a_06_cr/a_06_cr_mou/a_06_cr_mou.html
- Dydak, U., Jiang, Y. M., Long, L. L., Zhu, H., Chen, J., Li, W. M., . . . Zheng, W. (2011). In vivo measurement of brain GABA concentrations by magnetic resonance spectroscopy in smelters occupationally exposed to manganese. *Environ Health Perspect*, 119(2), 219-224.
- Dydak, U., Xu, J., Epur, A., Li, X., Streitmatter, S., Long, L.-L., . . . Jiang, Y.-M. (2011). Brain regions showing Manganese Accumulation in the human versus the rat brain. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, 19, 239.
- Ericson, J. E., Crinella, F. M., Clarke-Stewart, K. A., Allhusen, V. D., Chan, T., & Robertson, R. T. (2007). Prenatal manganese levels linked to childhood behavioral disinhibition. *Neurotoxicology and Teratology*, 29(2), 181-187.
- Erikson, K. M., Thompson, K., Aschner, J., & Aschner, M. (2007). Manganese neurotoxicity: a focus on the neonate. *Pharmacol Ther*, 113(2), 369-377.
- Finkelstein, Y., Zhang, N., Fitsanakis, V. A., Avison, M. J., Gore, J. C., & Aschner, M. (2008). Differential deposition of Manganese in the rat brain following subchronic exposure to manganese: a T1-weighted magnetic resonance imaging study. *Imaj*, 10, 793-798.
- Finley, J. W. (1999). Manganese absorption and retention by young women is associated with serum ferritin concentration. *Am J Clin Nutr*, 70, 37-43.

- Finley, J. W., Johnson, P. E., & Johnson, L. K. (1994). Sex affects manganese absorption and retention by humans from a diet adequate in manganese. *Am J Clin Nutr*, 60, 949-955.
- Fitsanakis, V. A., Zhang, N., Avison, M. J., Gore, J. C., Aschner, J. L., & Aschner, M. (2006). The use of magnetic resonance imaging (MRI) in the study of manganese neurotoxicity. *NeuroToxicology*, 27(5), 798-806.
- Frisbie, S. H., Mitchell, E. J., Dustin, H., Maynard, D. M., & Sarkar, B. (2012). World Health Organization discontinues its drinking-water guideline for manganese. *Environ Health Perspect*, 120(6), 775-778. doi:10.1289/ehp.1104693
- Grandjean, P., & Landrigan, P. J. (2014). Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The Lancet Neurology*, 13(3), 330-338.
- Guilarte, T. s. R., McGlothlan, J. L., Degaonkar, M., Chen, M.-K., Barker, P. B., Syversen, T., & Schneider, J. S. (2006). Evidence for Cortical Dysfunction and Widespread Manganese Accumulation in the Nonhuman Primate Brain following Chronic Manganese Exposure: A 1H-MRS and MRI Study. *Toxicological Sciences*, 94(2), 351-358.
- Gunier, R. B., Arora, M., Jerrett, M., Bradman, A., Harley, K. G., & Mora, A. M. (2015). Manganese in teeth and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ Res.*, 142. doi:10.1016/j.envres.2015.09.003
- Haynes, E., Sucharew, H., Kuhnell, P., Alden, J., Barnas, M., Wright, R., . . . Dietrich, K. (2015). Manganese Exposure and Neurocognitive Outcomes in Rural School-Age Children: The Communities Actively Researching Exposure Study (Ohio, USA). *Environmental Health Perspectives*, 123(10), 1066-1071.
- He, P., Liu, D., Zhang, G. Q., & Sun, M. (1994). Effects of high-level Manganese sewage irrigation on children's neurobehavior. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 28(4), 216-218.
- Health Canada. (1979). Manganese. Retrieved from http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/manganese/manganese-eng.pdf
- Hernández-Bonilla, D., Schilman, A., Montes, S., Rodríguez-Agudelo, Y., Rodríguez-Dozal, S., Solís-Vivanco, R., . . . Riojas-Rodríguez, H. (2011). Environmental exposure to manganese and motor function of children in Mexico. *NeuroToxicology*, 32(5), 615-621.
- Hobson, A., Seixas, N., Sterling, D., & Racette, B. A. (2011). Estimation of Particulate Mass and Manganese Exposure Levels among Welders. *Annals of Occupational Hygiene*, 55(1), 113-125.
- Huang, C. C., Chu, N. S., Lu, C. S., Chen, R. S., & Calne, D. B. (1998). Long-term progression in chronic manganism: ten years of follow-up. *Neurology*, 50(3), 698-700.
- Jiang, Y., Zheng, W., Long, L., Zhao, W., Li, X., Mo, X., . . . Pira, E. (2007). Brain magnetic resonance imaging and manganese concentrations in red blood cells of smelting workers: search for biomarkers of manganese exposure. *NeuroToxicology*, 28(1), 126-135.

- Josephs, K. A., Ahlskog, J. E., Klos, K. J., Kumar, N., Fealey, R. D., Trenerry, M. R., & Cowl, C. T. (2005). Neurologic manifestations in welders with pallidal MRI T1 hyperintensity. *Neurology*, 64(12), 2033-2039.
- Kawamura, R., Ikuta, S., Fukuzumi, S., Yamada, R., & Tsubaki, S. (1941). Intoxication by manganese in well water. *Kitasato Arch Exp Med*, 18, 145-171.
- Khan, K., Factor-Litvak, P., Wasserman, G. A., Liu, X., Ahmed, E., Parvez, F., . . . Graziano, J. H. (2011). Manganese Exposure from Drinking Water and Children's Classroom Behavior in Bangladesh. *Environ Health Perspect*, 119(10), 1501-1506.
- Khan, K., Wasserman, G. A., Liu, X., Ahmed, E., Parvez, F., Slavkovich, V., . . . Factor-Litvak, P. (2012). Manganese exposure from drinking water and children's academic achievement. *NeuroToxicology*, 33(1), 91-97.
- Kim, E. A., Cheong, H. K., Choi, D. S., Sakong, J., Ryoo, J. W., Park, I., & Kang, D. M. (2007). Effect of occupational manganese exposure on the central nervous system of welders: 1H magnetic resonance spectroscopy and MRI findings. *NeuroToxicology*, 28(2), 276-283.
- Kim, Y. (2004). High signal intensities on T1-weighted MRI as a biomarker of exposure to manganese. *Ind Health*, 42(2), 111-115.
- Kim, Y., Jeong, K. S., Song, H.-J., Lee, J.-J., Seo, J.-H., Kim, G.-C., . . . Chang, Y. (2011). Altered white matter microstructural integrity revealed by voxel-wise analysis of diffusion tensor imaging in welders with manganese exposure. *NeuroToxicology*, 32(1), 100-109.
- Kim, Y., Kim, B. N., Hong, Y. C., Shin, M. S., Yoo, H. J., Kim, J. W., . . . Cho, S. C. (2009). Co-exposure to environmental lead and manganese affects the intelligence of school-aged children. *NeuroToxicology*, 30(4), 564-571.
- Kim, Y., Kim, K. S., Yang, J. S., Park, I. J., Kim, E., Jin, Y., . . . Moon, Y. (1999). Increase in signal intensities on T1-weighted magnetic resonance images in asymptomatic manganese-exposed workers. *NeuroToxicology*, 20(6), 901-907.
- Kim, Y., & Park, s. (2014). Iron deficiency increases blood concentrations of neurotoxic metals in children. *Korean Journal of Pediatrics*, 57(8), 345-350.
- Klos, K. J., Chandler, M., Kumar, N., Ahlskog, J. E., & Josephs, K. A. (2006). Neuropsychological profiles of manganese neurotoxicity. *Eur J Neurol*, 13(10), 1139-1141.
- Komatsu, F., Kagawa, Y., Ishiguro, K., Kawabata, T., Purvee, B., Otgon, J., & Chimedregzen, U. (2009). The Association of Very High Hair Manganese Accumulation and High Oxidative Stress in Mongolian People. *Current Aging Science*, 2(1), 28-42.
- Kondakis, X. G., Makris, N., Leotsinidis, M., Prinou, M., & Papapetropoulos, T. (1989). Possible health effects of high manganese concentration in drinking water. *Arch Environ Health*, 44(3), 175-178.
- Krieger, D., Krieger, S., Jansen, O., Gass, P., Theilmann, L., & Lichtnecker, H. (1995). Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *The Lancet*, 346, 270-274.

- Lao, Y., dion, L.-A., Gilbert, G., Bouchard, M. F., Rocha, G., Wang, Y., . . . Saint-Amour, D. (2017). Mapping the basal ganglia alterations in children chronically exposed to manganese. *Scientific Reports*, 7.
- Lee, E. Y., Flynn, M. R., Du, G., Lewis, M. M., Herring, A. H., Van Buren, S., . . . Huang, X. (2016). Lower fractional anisotropy in the globus pallidus of asymptomatic welders, a marker for long-term welding exposure. *Toxicol Sci*, 153(1), 165-173.
- Lewis., Flynn, M. R., Lee, E. y., Van Buren, S., Van Buren, R., Du, G., . . . Huang, X. (2016). Longitudinal T1 relaxation rate (R1) captures changes in short-term Mn exposure in welders. *NeuroToxicology*, 57, 39-44.
- Li, S.-J., Jiang, L., Fu, X., Huang, S., Huang, Y.-N., Li, X.-R., . . . Jiang, Y.-M. (2014). Pallidal Index as Biomarker of Manganese Brain Accumulation and Associated with Manganese Levels in Blood: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 9(4), e93900.
- Llop, S., Lopez-Espinosa, M.-J., Rebagliato, M., & Ballester, F. (2013). Gender differences in the neurotoxicity of metals in children. *Toxicology*, 311, 3-12.
- Lo, C. P., Chen, S. Y., Lee, K. W., Chen, W. L., Chen, C. Y., Hsueh, C. J., & al., e. (2007). Brain injury after acute carbon monoxide poisoning: early and late complications. . *Neuroradiology*, 189, 205-211.
- Long, Z., Jiang, Y.-M., Li, X.-R., Fadel, W., Xu, J., Yeh, C.-L., . . . Dydak, U. (2014). Vulnerability of welders to manganese exposure – A neuroimaging study. *NeuroToxicology*, 45, 285-292.
- Loranger, S., Zayed, J., & Forget, E. (1994). Manganese contamination in Montreal in relation with traffic density. *Water, Air, and Soil Pollution*, 74(3), 385-396.
- Lucchini, R., Albin, E., Placidi, D., Gasparotti, R., Pigozzi, M. G., Montani, G., & Alessio, L. (2000). Brain magnetic resonance imaging and manganese exposure. *NeuroToxicology*, 21(5), 769-775.
- Lucchini, R., Guazzetti, S., Zoni, S., Donna, F., Peter, S., Zacco, A., . . . Smith, D. R. (2012). Tremor, olfactory and motor changes in italian adolescents exposed to historical ferro-manganese emission. *NeuroToxicology*, 33(4), 687-696.
- Madison, J. L., Wegrzynowicz, M., Aschner, M., & Bowman, A. B. (2011). Gender and manganese exposure interactions on mouse striatal neuron morphology. *Neurotoxicology*, 32(6), 896-906. doi:10.1016/j.neuro.2011.05.007
- Menezes-Filho, J. A., Novaes Cde, O., Moreira, J. C., Sarcinelli, P. N., & Mergler, D. (2011). Elevated manganese and cognitive performance in school-aged children and their mothers. *Environ Res*, 111(1), 156-163.
- Menezes-Filho, J. A., Paes, C. R., de C. Pontes, Ç. M., Moreira, J. C., Sarcinelli, P. N., & Mergler, D. (2009). High levels of hair manganese in children living in the vicinity of a ferro-manganese alloy production plant. *NeuroToxicology*, 30(6), 1207-1213.
- Menezes-Filho, J. A., Viana, G. F., Ferreira, J. R., Menezes Filho, J., Abreu, N., Nunes, L., & Mergler, D. (2014). Elevated manganese exposure and school-aged children's behavior: A gender-stratified analysis. *NeuroToxicology*, 45, 293-300.

- Mergler, D. (2012). Neurotoxic exposures and effects: Gender and sex matter! Hänninen Lecture 2011. *NeuroToxicology*, 33(4), 644-651. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2012.05.009>
- Mergler, D., & Baldwin, M. (1997). Early manifestations of manganese neurotoxicity in humans: an update. *Environ Res*, 73(1-2), 92-100.
- Mergler, D., Huel, G., Bowler, R. M., Iregren, A., Belanger, S., Baldwin, M., . . . Martin, L. (1994). Nervous System Dysfunction among Workers with Long-Term Exposure to Manganese. *Environmental Research*, 64(2), 151-180.
- Ministère du Développement durable de l'Environnement et des Parcs du Québec (2014). [Personal communication from C. Robert.].
- Mora, A. M., Arora, M., Harley, K. G., Kogut, K., Parra, K., & Hernández-Bonilla, D. (2015). Prenatal and postnatal manganese teeth levels and neurodevelopment at 7, 9, and 10.5 years in the CHAMACOS cohort. *Environ Int*, 84.
- Moreno, J. A., Yeomans, E. C., Streifel, K. M., Brattin, B. L., Taylor, R. J., & Tjalkens, R. B. (2009). Age-Dependent Susceptibility to Manganese-Induced Neurological Dysfunction. *Toxicological Sciences*, 112(2), 394-404.
- Nascimento, S., Baierle, M., Göethel, G., Barth, A., Brucker, N., Charão, M., . . . Moresco, R. (2016). Associations among environmental exposure to manganese, neuropsychological performance, oxidative damage and kidney biomarkers in children. *Environmental Research*, 147, 32-43.
- Neal, A. P., & Guilarte, T. R. (2013). Mechanisms of lead and manganese neurotoxicity. *Toxicol Res*, 2(2), 99-114.
- Nelson, K., Golnick, J., Korn, T., & Angle, C. (1993). Manganese encephalopathy: utility of early magnetic resonance imaging. *Br J Ind Med*, 50(6), 510-513.
- O'Neal, A. L., & Zheng, W. (2015). Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Curr Envir Health Rpt*, 2, 315-328.
- Organisation Mondiale de la Santé. (2011). Guidelines for Drinking-Water Quality. 4th ed. Retrieved from http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/
- Oulhote, Y., Mergler, D., Barbeau, B., Bellinger, D., Bouffard, T., Brodeur, M.-È., . . . Bouchard, M. F. (2014). Neurobehavioral Function in School-Age Children Exposed to Manganese in Drinking Water. *Environmental Health Perspectives*, 122(12), 1343-1350.
- Oulhote, Y., Mergler, D., & Bouchard, M. F. (2014). Sex- and age-differences in blood manganese levels in the U.S. general population: national health and nutrition examination survey 2011-2012. *Environ Health*, 13(87).
- Pal, P. K., Samii, A., & Calne, D. B. (1999). Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *NeuroToxicology*, 20(2-3), 227-238.
- Park, J. d., Chung, Y. H., Kim, C. Y., Ha, C. S., Yang, S. O., Khang, H. S., . . . Yu, I. J. (2007). Comparison of High MRI T1 Signals with Manganese Concentration in Brains of Cynomolgus Monkeys After 8 Months of Stainless Steel Welding-Fume Exposure. *Inhalation Toxicology*, 19(11), 965-971.

- Perl, D. P., & Olanow, C. W. (2007). The neuropathology of manganese-induced Parkinsonism. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66(8), 675-682.
- Racette, B. A., McGee-Minnich, L., Moerlein, S. M., Mink, J. W., Videen, T. O., & Perlmutter, J. S. (2001). Welding-related parkinsonism: clinical features, treatment, and pathophysiology. *Neurology*, 56(1), 8-13.
- Racette, B. A., Tabbal, S. D., Jennings, D., Good, L., Perlmutter, J. S., & Evanoff, B. (2005). Prevalence of parkinsonism and relationship to exposure in a large sample of Alabama welders. *Neurology*, 64(2), 230-235.
- Rahman, S., Kippler, M. J., Tofail, F., Bölte, S., Hamadani, J., & Vahter, M. (2016). Manganese in Drinking Water and Cognitive Abilities and Behavior at 10 Years of Age: A Prospective Cohort Study. *Environmental Health Perspectives*.
- Riojas-Rodriguez, H., Solis-Vivanco, R., Schilmann, A., Montes, S., Rodriguez, S., Rios, C., & Rodriguez-Agudelo, Y. (2010). Intellectual Function in Mexican Children Living in a Mining Area and Environmentally Exposed to Manganese. *Environ Health Perspect*, 118(10), 1465-1470.
- Rodier, J. (1955). Manganese Poisoning in Moroccan Miners. *British Journal of Industrial Medicine*, 12(1), 21-35.
- Roels, H. A., Bowler, R. M., Kim, Y., Claus Henn, B., Mergler, D., Hoet, P., . . . Téllez Rojo, M. (2012). Manganese exposure and cognitive deficits: A growing concern for manganese neurotoxicity. *NeuroToxicology*, 33(4), 872-880.
- Rugless, F., Bhattacharya, A., Succop, P., Dietrich, K. N., Cox, C., Alden, J., . . . Haynes, E. N. (2014). Childhood Exposure to Manganese and Postural Instability in Children living near a Ferromanganese Refinery in Southeastern Ohio. *Neurotoxicology and Teratology*, 41, 71-79.
- Sahni, V., Leger, Y., Panaro, L., Allen, M., Giffin, S., Fury, D., & Hamm, N. (2007). Case report: a metabolic disorder presenting as pediatric manganism. *Environ Health Perspect*, 115(12), 1776-1779.
- Sandman, C. A., Head, K., Muftuler, L. T., Su, L., Buss, C., & Davis, E. P. (2014). Shape of the basal ganglia in preadolescent children is associated with cognitive performance. *NeuroImage*, 99, 93-102.
- Santé Canada. (1987). Le manganèse. Retrieved from <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/manganese/index-fra.php>
- Santé Canada. (2010). Évaluation du risque pour la santé humaine du manganèse inhalé Retrieved from <http://canadiensensante.gc.ca/publications/healthy-living-vie-saine/manganese/index-fra.php>
- Santé Canada. (2016). *Manganese in drinking water*.
- Sato, K., Ueyama, H., Arakawa, R., Kumamoto, T., & Tsuda, T. (2000). A case of welder presenting with parkinsonism after chronic manganese exposure. *Rinsho Shinkeigaku*, 40(11), 1110-1115.
- Schneider, J. S., Decamp, E., Clark, K., Bouquio, C., Syversen, T., & Guilarte, T. R. (2009). Effects of Chronic Manganese Exposure on Working Memory in Non-Human Primates. *Brain Research*, 1258, 86-95.
- Schroll, H., Horn, A., Gröschel, C., Brücke, C., Lütjens, G., Schneider, G.-H., . . . Hamker, F. H. (2015). Differential contributions of the globus pallidus and

- ventral thalamus to stimulus-response learning in humans. *NeuroImage*, 122, 233-245.
- Sen, S., Flynn, M. R., Du, G., Troster, A. I., An, H., & Huang, X. (2011). Manganese accumulation in the olfactory bulbs and other brain regions of "asymptomatic" welders. *Toxicol Sci*, 121(1), 160-167.
- Seo, J., Chang, Y., Jang, K. E., Park, J. W., Kim, Y. T., Park, S. J., . . . Kim, Y. (2016). Altered executive function in the welders: a functional magnetic resonance imaging study. *Neurotoxicol Teratol*, 56, 26-34.
- Shin, Y. C., Kim, E., Cheong, H.-K., Cho, S., Sakong, J., Kim, K. S., . . . Kim, Y. (2007). High signal intensity on magnetic resonance imaging as a predictor of neurobehavioral performance of workers exposed to manganese. *NeuroToxicology*, 28(2), 257-262.
- Smith, D., Gwiazda, R., Bowler, R. M., Roels, H. A., Park, R., Taicher, C., & Lucchini, R. (2001). Biomarkers of Mn exposure in humans. *American journal of industrial medicine*, 50, 801-811.
- Takser, L., Mergler, D., Hellier, G., Sahuquillo, J., & Huel, G. (2003). Manganese, Monoamine Metabolite Levels at Birth, and Child Psychomotor Development. *NeuroToxicology*, 24(4-5), 667-674.
- Valdés Hernandez, M. C., Maconick, L. C., Tan, E. M., & Wardlaw, J. M. (2012). Identification of mineral deposits in the brain on radiological images: a systematic review. *Eur Radiol*, 22, 2371-2381.
- Van den Hoven, T., & Slaats, N. (2006). Lead monitoring. In P. Quevaullier & K. Thompson (Eds.), *Analytical Methods for Drinking Water, Advances in Sampling and Analysis*. Hoboken, NJ: Wiley.
- Van Schouwenburg, M. R., Onnink, A. M. H., ter Huurne, N., Kan, C. C., Zwiers, M. P., Hoogman, M., . . . Cools, R. (2014). Cognitive flexibility depends on white matter microstructure of the basal ganglia. *Neuropsychologia*, 53, 171-177.
- Vieregge, P., Heinzow, B., Korf, G., Teichert, H.-M., Schleifenbaum, P., Möisinger, H.-U. (1995). Rural well water has no neurological effects. *The canadian journal of neurological sciences*, 22(4), 286-289.
- Wasserman, G. A., Liu, X., Parvez, F., Ahsan, H., Levy, D., & Factor-Litvak, P. (2006). Water manganese exposure and children's intellectual function in Araihasar, Bangladesh. *Environ Health Perspect.*, 114, 124-129.
- Wasserman, G. A., Liu, X., Parvez, F., Factor-Litvak, P., Ahsan, H., Levy, D., . . . Graziano, J. H. (2011). Arsenic and manganese exposure and children's intellectual function. *NeuroToxicology*, 32(4), 450-457.
- Wasserman, G. A., Liu, X., Parvez, F., Factor-Litvak, P., Kline, J., Siddique, A., . . . Graziano, J. (2016). Child Intelligence and Reductions in Water Arsenic and Manganese: A Two-Year Follow-up Study in Bangladesh. *Environmental Health Perspectives*, 124(7), 1114-1120.
- Wechsler, D. (1999). *Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence (WASI)*. San Antonio, Texas: Harcourt Assessment.
- Wright, R. O., Amarasiriwardena, C., Woolf, A. D., Jim, R., & Bellinger, D. C. (2006). Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese, and

- cadmium levels in school-age children residing near a hazardous waste site. *NeuroToxicology*, 27(2), 210-216.
- Yim, H. W., Kim, J. H., Phee, Y. G., Koo, J. W., Lee, K.-S., Park, C. Y., . . . Jang, H. S. (1998). An association between brain MRI and neurologic findings in welders exposed to manganese fume. *Korean J Occup Environ Med.*, 10(2), 161-171.
- Zheng, W., Fu, S. X., Dydak, U., & Cowan, D. M. (2011). Biomarkers of manganese intoxication. *NeuroToxicology*, 32(1), 1-8.
- Zheng, W., Kim, H., & Zhao, Q. (2000). Comparative toxicokinetics of manganese chloride and methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) in Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 54(2), 295-301.